



**João Henrique de Matos Chambel**

**Contribuição para o estudo da remoção em  
ETAR de  $17\beta$ -estradiol e de  $17\alpha$ -  
etinilestradiol no tratamento biológico**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Sanitária

Orientadora: Professora Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro 2011**



A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Prof.<sup>a</sup> Doutora Rita Maurício, por me aceitar como seu orientando, e pela motivação, apoio e disponibilidade desde o início.

Ao Prof. José Sardinha pela disponibilidade e esclarecimento de algumas dúvidas no decorrer do trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio, investimento e esforço pessoal que sempre empregaram para o meu sucesso escolar e por todas as vezes que me “deram na cabeça”, o que serviu como motivação para a conclusão do curso.

À minha irmã Inês, pelos momentos de descontração e apoio em algumas fases do trabalho.

Aos meus avós e padrinhos, pelo encorajamento e por terem acreditado em mim, mesmo nos momentos mais complicados.

Aos meus amigos da faculdade (por esta não estavam à espera!) e fora da faculdade, pelo companheirismo, apoio, discussões e brincadeiras que tornaram mais fácil este longo percurso.

Um agradecimento especial à Andreia, pela companhia e ajuda neste trabalho e ao Tiago pela incansável paciência, apoio e companheirismo que me ajudaram nos bons e maus momentos.

Por fim, mas não por último, quero agradecer a todos aqueles que, mesmo indirectamente contribuíram com palavras e acções de apoio, que foram importantes para mim e me ajudaram neste percurso.

A todos, muito obrigado!



## Resumo

Os efeitos adversos decorrentes da exposição a compostos desreguladores endócrinos, em humanos e animais, têm sido alvo do interesse da comunidade científica nas últimas décadas.

Os desreguladores endócrinos têm origem em produtos como pesticidas, plásticos, detergentes, tintas, fármacos, resíduos industriais e domésticos. No entanto, também se devem incluir neste grupo as hormonas produzidas, utilizadas e consecutivamente eliminadas pelo Homem e animais.

De um modo geral, os compostos desreguladores endócrinos são lipofílicos e semi-voláteis, o que facilita a sua dispersão no ambiente, principalmente através da água. As águas residuais são a fonte mais comum de contaminação e, segundo a literatura, estas substâncias não são totalmente removidas nos sistemas de tratamento de água e água residual.

No presente estudo, seleccionaram-se dois compostos desreguladores endócrinos: o 17 $\beta$ -estradiol e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol. Quando presentes em águas residuais, estes compostos apresentam um elevado potencial tóxico para os seres vivos, podendo apresentar efeitos adversos mesmo quando presentes em concentrações muito baixas.

Esta dissertação pretende dar um contributo relativamente aos métodos de detecção destes compostos, as concentrações presentes em ETAR, bem como as taxas de remoção atingidas, dando especial atenção aos sistemas de biomassa fixa.

**Palavras-chave:** *compostos desreguladores endócrinos, estrogénios, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol, ETAR, sistemas de biomassa fixa.*





## Abstract

In recent decades, one of the issues that have created a growing scientific interest with regard to adverse effects is the human and animal exposure to endocrine disrupting compounds.

These substances are derived from products such as pesticides, plastics, detergents, paints, pharmaceuticals, industrial and domestic waste. However, it also should be included in this group of hormones produced, used and consecutively eliminated by humans and animals.

In general, endocrine disrupting compounds are lipophilic and semi-volatile, which facilitates its dispersion into the environment, mainly through the water. Wastewater is the most common source of contamination of these compounds and, according to literature, these substances are not totally removed in water and wastewater treatment systems.

In this study, there were selected two compounds endocrine disrupters: the 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. When present in wastewater, these compounds have a high toxic potential to living beings, and may have adverse effects even at very low concentrations.

This paper will discuss methods to detect these compounds, the concentrations in WWTP, and removal rates, giving particular attention to attached growth systems.

**Keywords:** *endocrine disrupting compounds, estrogen, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, WWTP, attached growth systems.*



## Simbologia

**$\gamma_{SAT}$**  – Peso volúmico saturado

**APE** – Alquilfenóis

**C<sub>18</sub>** – Octadecilsilano

**CAG** – Carvão Activado Granular

**CAS nº.** – *Chemical Abstracts Service*

**CBO<sub>5</sub>** – Carência Bioquímica de Oxigénio

**CSTEE** – *Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment*

**CQO** – Carência Química de Oxigénio

**DDT** – Dicloro-Difenil-Tricloroetano

**DES** – dietilestilbestrol

**E<sub>1</sub>** – estrona

**E<sub>2</sub>** – 17 $\beta$ -estradiol

**E<sub>3</sub>** – estriol

**EDC** – Compostos Desreguladores Endócrinos

**EE<sub>2</sub>** – 17 $\alpha$ -etinilestradiol

**ELISA** – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**EPA** – *Environmental Protection Agency*

**ESI** – *Interface Electrospray*

**ETAR** – Estação de Tratamento de Águas Residuais

**Fe<sup>2+</sup>** – Ferro na forma reduzida

**GC-MS/MS** – Cromatografia Gasosa acoplada a duas Espectrometrias de Massa

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogénio

**HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography*

**HRGC** – Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

**IEH** – *Institute of Environment and Health*

**IPCS** – Programa Internacional de Segurança Química

**K<sub>oc</sub>** – Coeficiente de Partição Carbono/Água

**LA** – Lamas Activadas

**LC-MS/MS** – Cromatografia Líquida acoplada a duas Espectrometrias de Massa

**LD** – Limite de Detecção

**log K<sub>ow</sub>** – Coeficiente de Partição Octanol/Água

**LP** – Leito Percolador

**LQ** – Limite de Quantificação

**MBR** – Biorreactores de Membrana

**MF** – Microfiltração

**MnO<sub>2</sub>** – Dióxido de Manganês

**NCI** – *Negative Chemical Ionization*

**NF** – Nanofiltração

**NQA** – Normas de Qualidade Ambiental

**OCDE** – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

**OI** – Osmose Inversa

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**pK<sub>a</sub>** – Constante de Acidez

**POA** – Processos Oxidativos Avançados

**RIA** – *Radio Immuno Assay*

**SPE** – *Solid Phase Extraction*

**TiO<sub>2</sub>** – Dióxido de Titânio

**TRH** – Tempo de Retenção Hidráulico

**UF** – Ultrafiltração

**US EPA** – Agência de Protecção Ambiental Norte-Americana

**UV** – Radiação Ultravioleta

**VTG** – Vitelogenina

**YES** – *Yeast Estrogen Screen*



# Índice

1	Introdução .....	1
2	Objectivos.....	3
3	Metodologia e Estrutura da Dissertação .....	5
4	Compostos Desreguladores Endócrinos .....	7
4.1	Aspectos Gerais .....	7
4.2	Evolução Histórica .....	10
4.3	Legislação.....	12
4.4	Sistema Endócrino .....	14
4.5	Hormonas Naturais e Sintéticas .....	18
4.5.1	Fontes de EDC.....	21
4.5.2	Efeitos dos EDC.....	27
4.5.3	Vitelogenina (VTG).....	29
5	Métodos e Técnicas de Detecção de EDC .....	33
5.1	Relevância dos Métodos e Técnicas de Detecção .....	33
5.2	Técnicas Cromatográficas.....	34
5.3	Ensaio Biológico.....	36
5.4	Comparação dos Métodos de Detecção .....	38
6	Sistemas de Tratamento de Águas Residuais.....	47
6.1	Tratamento Preliminar .....	48
6.2	Decantação Primária .....	49
6.3	Tratamento Secundário ou Biológico .....	50
6.3.1	Leitos Percoladores .....	51

6.3.2	Discos Biológicos .....	53
6.3.3	Lamas Activadas .....	54
6.3.4	Biorreactores de Membranas .....	55
6.4	Tratamento Terciário ou Tratamentos Avançados .....	56
7	Sistemas de Tratamento de Biomassa Fixa Vs. Sistemas de Tratamento de Biomassa Suspensa .....	59
7.1	Estudos de concentrações em ETAR .....	59
8	Conclusões .....	73
9	Perspectivas Futuras .....	75
10	Bibliografia .....	77



## Índice de Figuras

Figura 4.2 - Desregulação Endócrina. (a) Resposta Natural; (b) Efeito Agonista; (c) Efeito Antagonista .....	16
Figura 4.3 - Mecanismos de acção dos EDC sobre o sistema endócrino .....	17
Figura 4.4 - Esquema dos vários pontos de entrada dos estrogénios naturais e sintéticos ...	23
Figura 4.6 - Representação esquemática simplificada da sequência de processos que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos .....	30
Figura 5.1 - Exemplo de detecção de $E_1$ , $E_2$ e $EE_2$ através de cromatografia gasosa acoplada a uma espectrometria de massa .....	36
Figura 5.4 - Variabilidade dos métodos de detecção .....	43
Figura 5.5 - Selectividade dos métodos de detecção .....	44
Figura 5.6 - Custos dos métodos de detecção .....	45
Figura 6.1 - Diagrama linear simplificado de uma ETAR .....	49
Figura 6.2 - Mecanismo de remoção de EDC durante a decantação primária .....	50
Figura 6.3 - Mecanismos de remoção de EDC durante o tratamento secundário numa ETAR .....	51
Figura 6.5 - Esquema de um sistema de tratamento por Discos Biológicos .....	53
Figura 6.7 - Esquema de um MBR acoplado com NF e OI .....	56
Figura 7.2 - Percentagem de remoção de $E_2$ para sistemas maioritariamente constituídos por Leitos Percoladores .....	66

Figura 7.3 - Esquema da degradação de EE <sub>2</sub> através do oxidante MnO <sub>2</sub> .....	71
--	----

## Índice de Tabelas

Tabela 4.1 - Resumo histórico dos programas sobre EDC.....	13
Tabela 4.2 - Propriedades físico-químicas dos EDC em estudo .....	19
Tabela 4.3 - Uso de estrogénios em produtos farmacêuticos .....	23
Tabela 4.4 - Excreção diária ( $\mu\text{g}$ ) <i>per capita</i> de estrogénios pelo Homem .....	25
Tabela 4.5 - Excreção diária de estrogénio total estimada por diferentes espécies de animais ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) .....	26
Tabela 5.1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de imunoensaio .....	37
Tabela 5.2 - Classificação das técnicas de detecção de EDC para diferentes matrizes ambientais .....	41
Tabela 6.1 - Exemplos de tecnologias usadas nos POA.....	58
Tabela 7.1 - Concentrações e métodos de detecção do $\text{E}_2$ .....	60
Tabela 7.2 - Concentrações e métodos de detecção do $\text{EE}_2$ .....	61
Tabela 7.3 - Remoção de estrogénios monitorizados na ETAR de Penha/RJ - Brasil, para sistemas de biomassa fixa e suspensa.....	63
Tabela 7.4 - Processos e características de funcionamento das ETAR no estudo de Janex-Habibi <i>et al.</i> , 2009.....	64
Tabela 7.5 - Remoção de estrogénios para os diferentes sistemas de tratamento .....	67
Tabela 7.6 - Valores das constantes K e N para a estimativa de custos de primeiro investimento, para as tecnologias de tratamento secundário consideradas .....	69



# 1 Introdução

A poluição química das águas de superfície e das águas residuais pode originar efeitos adversos no ambiente. Alguns destes efeitos têm a capacidade de simular ou alterar a actividade hormonal tanto dos animais, como dos seres humanos. Deste modo, a comunidade científica tem dedicado atenção a este aspecto, por forma a minimizar impactes no Ambiente (Birket e Lester, 2003; Bila e Dezotti, 2007; Liu *et al.*, 2009).

As hormonas sexuais, excretadas através da urina e das fezes pelo Homem e outros animais, ou provenientes de efluentes e resíduos de indústrias preocupam os Engenheiros Sanitaristas, uma vez que o ineficaz tratamento destes efluentes e resíduos e consequente lançamento dos mesmos nos meios receptores pode provocar a contaminação do ambiente (ex. meio aquático) (Guimarães, 2008).

Para avaliar o risco potencial destas substâncias é importante a sua detecção e quantificação, na diversidade dos ecossistemas. A detecção poderá tornar-se uma tarefa difícil devido à complexidade dos ecossistemas e da baixa concentração a que estas hormonas, naturais e sintéticas, se encontram presentes no ambiente.

As causas da contaminação por estes compostos deverão ser identificadas e as emissões deverão ser tratadas na origem, com carácter prioritário, da maneira mais eficaz, tendo em consideração aspectos ambientais e também económicos.



## 2 Objectivos

O presente estudo pretende contribuir para o estudo comparativo das concentrações de estrogénios, nomeadamente o  $17\beta$ -estradiol e o  $17\alpha$ -etinilestradiol, em ETAR e uma comparação das taxas de remoção destes compostos através dos processos de tratamento presentes, dando especial atenção aos sistemas de biomassa fixa.





### **3 Metodologia e Estrutura da Dissertação**

Esta dissertação baseou-se numa revisão bibliográfica através da qual se tentou contribuir para um melhor entendimento e sensibilização dos potenciais efeitos causados pela presença de compostos desreguladores endócrinos no meio hídrico.

De forma a cumprir os objectivos estabelecidos, este trabalho encontra-se organizado em nove capítulos, nomeadamente:

- (i) O primeiro capítulo, onde foi elaborada uma pequena introdução ao tema;
- (ii) No segundo foram estabelecidos os objectivos principais da presente dissertação;
- (iii) O terceiro onde se apresentou a estrutura do trabalho;
- (iv) O quarto onde se elaborou uma revisão da literatura acerca dos compostos desreguladores endócrinos que foi dividido em vários subcapítulos, nomeadamente:
  - Compostos Desreguladores Endócrinos
  - Evolução Histórica
  - Legislação
  - Sistema Endócrino
  - Hormonas Naturais e Sintéticas (Fontes e Efeitos)
- (v) No quinto capítulo onde foram estudados os métodos e técnicas de detecção destes compostos nos sistemas aquáticos;
- (vi) No capítulo seis onde se apresentaram vários tipos de sistemas de tratamento de águas residuais;
- (vii) O sétimo capítulo onde se pretendeu elaborar uma apresentação e discussão de estudos de remoção de compostos estrogénicos em ETAR, realizados por vários autores;
- (viii) Os capítulos oito e nove onde foi feita uma síntese das conclusões e são expressas algumas sugestões para linhas futuras de investigação respectivamente.



## 4 Compostos Desreguladores Endócrinos

### 4.1 Aspectos Gerais

A presença de substâncias no ambiente que têm o potencial de perturbar o funcionamento normal do sistema endócrino dos animais e do Homem, tornou-se um assunto importante, de crescente preocupação em todo o mundo, uma vez que estes compostos poderão originar alterações do crescimento, desenvolvimento ou reprodução de animais. Estas mudanças podem ser verificadas praticamente de forma imediata, ou mais tarde no ciclo de vida do organismo, ou até mesmo apenas em gerações futuras (Belfroid *et al.*, 1999; Servos *et al.*, 2005; Bila e Dezotti, 2007; Liu *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2010). Essas substâncias são conhecidas como Compostos Desreguladores Endócrinos (EDC).

Os EDC são uma categoria relativamente recente de compostos dominantes que rapidamente se dispersam no ambiente. Normalmente são libertados para a atmosfera resultantes da combustão e incineração de determinados produtos ou pela descarga de efluentes de ETAR urbanas ou efluentes industriais, tendo-se registando as maiores concentrações em águas subterrâneas, rios e lagos (Auriol *et al.*, 2006).

Sendo ainda um assunto recente, presente e estudado em várias áreas são encontradas várias definições para os EDC. No entanto adoptaram-se as definições da *United States Environment Protection Agency* (US EPA) e da Comissão Europeia.

De acordo com US EPA, um desregulador endócrino é definido como “*um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, acção ou eliminação de hormonas naturais no corpo, sendo estas responsáveis pela manutenção da homeostasia (preservação da constância interna), reprodução, desenvolvimento e comportamento dos organismos*” (US EPA, 1997; Bila e Dezotti, 2007; Liu *et al.*, 2009). A Comissão Europeia, através da COM (1999) 706, acrescenta os efeitos adversos dos EDC quando em contacto com os organismos expostos (Comissão Europeia, 1999; Reis Filho *et al.*, 2006).

Actualmente, os EDC estão presentes em produtos de grande consumo que são muito utilizados no dia-a-dia das populações, podendo ser encontrados em produtos farmacêuticos comuns (ex. pílula contraceptiva), pesticidas, plásticos, produtos industriais, etc. (Auriol *et al.*, 2006).

Porque as definições de EDC da US EPA e da Comissão Europeia incluem uma panóplia enorme de compostos, houve necessidade de dividir os EDC em determinados grupos. Os principais grupos de EDC são os estrogénios naturais, os estrogénios sintéticos, os fitoestrogénios e compostos químicos industriais, sendo que os estrogénios naturais e sintéticos são aqueles que provocam efeitos mais nocivos no ambiente (Auriol *et al.*, 2006). As substâncias sintéticas com actividade estrogénica também são denominadas de xenoestrogénios por alguns autores (Desbrow *et al.*, 1998; Larsson *et al.*, 1999; Körner *et al.*, 2000; Tilton *et al.*, 2002; Rudder *et al.*, 2004; Schiliró *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Auriol *et al.*, 2006; Reis Filho *et al.*, 2006; Cirja *et al.*, 2008; Janex-Habibi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Rodgers-Gray *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2011).

Os grupos de compostos mais estudados são os estrogénios naturais, tais como a estrona ( $E_1$ ),  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), estriol ( $E_3$ ) e os alquilfenóis (APE), inicialmente sintetizados no organismo e essenciais para as características femininas e reprodução, assim como, os estrogénios sintéticos, compostos que são capazes de imitar a acção dos esteróides naturais, por exemplo, bisfenol A,  $17\alpha$ -etinilestradiol ( $EE_2$ ), mestranol, pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares e fitoestrogénios (Belfroid *et al.*, 1999; Auriol *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2010).

Vários investigadores identificaram os compostos  $E_2$  e  $EE_2$  como os principais contribuintes da actividade estrogénica do efluente das estações de tratamento de águas residuais (ETAR), uma vez que são, maioritariamente, excretados através da urina e das fezes. Estas substâncias são encontradas no ambiente, nas formas conjugada e não conjugada, em concentrações da ordem de  $\mu\text{g/l}$  e  $\text{ng/l}$  e a sua potência é suficiente para causar efeitos adversos à saúde humana e animal (Holbrook *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2005; Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Stumpe e Marschener, 2007).

A poluição ambiental provocada por EDC presentes em efluentes de águas residuais descarregadas nos meios receptores é hoje motivo de grande preocupação, especialmente quando afecta os sistemas aquáticos (Cirja *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008).

Uma das formas mais comuns de exposição dos organismos com os EDC é através do contacto com a água contaminada (por exemplo, rios, albufeiras, águas subterrâneas). Os EDC podem contaminar a água de várias formas:

- **Fontes pontuais** – efluentes de estações de tratamento de águas residuais, efluentes de indústrias, efluentes da actividade agrícola, lixiviados, etc..
- **Fontes difusas** – infiltração no solo de compostos utilizados na agricultura e indústria, até atingirem os lençóis freáticos, recarga de aquíferos com água contaminada, fossas sépticas, espalhamento de lamas provenientes do tratamento de águas residuais, entre outros. (Maurício, 2008).

Durante muitos anos, a quantificação da poluição da água baseava-se apenas na monitorização da carência bioquímica de oxigénio (CBO), carência química de oxigénio (CQO), nitratos, fosfatos e sólidos suspensos totais (Cirja *et al.*, 2008). Actualmente tem-se dado importância à detecção de compostos estrogénicos em rios, zonas costeiras e nos sedimentos do leito dos rios, lagos e estuários. No entanto, ainda não estão suficientemente estudadas as características do movimento ou a degradação de cada um dos estrogénios humanos nos sistemas de tratamento de águas residuais (Braga *et al.*, 2005). Assim sendo, a chave para a solução deste problema é a identificação dos EDC, a medida exacta da sua presença nos sistemas aquáticos e implementação de estratégias de controlo adequadas (Holbrook *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009).

## **4.2 Evolução Histórica**

Um dos primeiros artigos publicados sobre a presença de compostos estrogénicos em águas residuais foi sugerido por Stumm-Zollinger e Fair em 1965, mostrando que esses compostos não foram completamente eliminados durante o processo de tratamento (Huang e Sedlak, 2001; Gerolin, 2008; Campani *et al.*, 2010)

O termo “desregulador endócrino” foi pela primeira vez utilizado, em Julho de 1991, num congresso no Centro de Conferência Wingspread, Racine, Wisconsin, nos Estados Unidos, realizado por Theo Colborn e seus colaboradores. A primeira publicação que mencionou este termo data de 1992 (Matthiessen *et al.*, 2003; Gerolin, 2008).

Um dos estudos mais mencionados sobre os desreguladores endócrinos é o do *Dicloro-Difenil-Tricloroetano* (DDT) e seus subprodutos, um pesticida muito utilizado em todo mundo durante as décadas de 50 e 60 e que ainda hoje é usado em alguns países, na sua maioria países africanos, como forma de combate contra a malária. Estudos mostraram que o DDT é persistente no ambiente, que apresenta actividade estrogénica e que pode afectar o sistema reprodutivo de mamíferos e aves da região dos Grandes Lagos (EUA-Canadá). Outro exemplo são as anomalias detectadas no sistema reprodutivo de jacarés e tartarugas, em vários lagos da Flórida, contaminados com tóxicos agrícolas (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Gerolin, 2008).

Historicamente, o foco nos estrogénios como desreguladores das funções reprodutivas resultou de uma epidemia que surgiu com a receita de grandes doses de dietilestilbestrol (DES) para milhões de mulheres grávidas em todo o mundo entre 1947 e 1971. Este fármaco foi prescrito por médicos como contraceptivo. Entretanto, durante várias décadas, foi receitado durante a gravidez de forma a prevenir o aborto, mas foi recomendado também para gravidez normal, para promover o crescimento fetal, suprimir a produção de leite da mulher depois da gravidez e aliviar sintomas da menopausa. Posteriormente descobriu-se que este medicamento causou alterações na fertilidade e performance reprodutiva nos descendentes das mulheres expostas ao DES. Quando esta relação causa efeito foi

demonstrada, a administração da droga parou de imediato (Veras, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Gerolin, 2008; Guimarães, 2008; Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Estudos recentes sugerem que substâncias estrogénicas, como o DES, podem apresentar efeitos prolongados no sistema reprodutivo em humanos expostos *in utero*. Os efeitos relatados a curto, médio e longo prazo do DES têm servido como exemplo e de comparação para os efeitos da exposição de seres humanos aos desreguladores endócrinos (Veras, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Gerolin, 2008; Guimarães, 2008; Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Desde a década de 70 até o início dos anos 90, houve um aumento da preocupação na comunidade científica em relação aos possíveis efeitos prejudiciais causados ao Homem e outros organismos. Concluiu-se que, após a exposição a níveis significativos de substâncias químicas persistentes, produzidas pelo Homem, animais como moluscos, peixes, aves, répteis e mamíferos, desenvolveram alterações no sistema endócrino que provocaram distúrbios reprodutivos, como por exemplo *imposex*, hermafroditismo, masculinização/feminização, perturbações no relacionamento sexual ou declínio da população (Bila e Dezotti, 2007; Gerolin, 2008; Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Apenas na década de 90, este assunto começou a ter uma maior projecção na comunidade científica ligada às questões ambientais. Este interesse surgiu devido a um aumento da detecção de efeitos adversos na saúde humana e de animais, possivelmente tendo como causa principal a acção dos EDC, isto é, a estudos de relação causa/efeito (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007).

Muitos dos estrogénios naturais e sintéticos presentes no meio aquático provém de águas residuais. Nos EUA e no Reino Unido, registou-se um aumento dos níveis de vitelogenina (VTG) em peixes macho, presentes a jusante de estações de tratamento de águas residuais (Körner *et al.*, 2000; Diniz, 2005; Sanchez, 2006; Gerolin, 2008). A vitelogenina é uma proteína complexa, precursora para a produção de vitelo em todos os vertebrados ovíparos e é sintetizada pelo fígado em resposta aos estrogénios endógenos (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Diniz *et al.*, 2010).

É ainda conhecido que os estrogénios sintéticos, etinilestradiol e mestranol, são usados em contraceptivos orais e não são completamente biodegradados ou removidos em ETAR (Körner *et al.*, 2000; Shiliró *et al.*, 2004).

É de notar que, desde a origem desta problemática, tem sido investigada a presença de EDC em efluentes de ETAR e água potável. Porém, recentemente tem-se estudado também formas que visem a sua remoção para evitar a sua descarga e consequente introdução no ciclo da água (Campani *et al.*, 2010). Por forma a melhorar a remoção destes compostos em ETAR, é importante também o desenvolvimento de métodos de detecção analítica que permitam aumentar a abrangência dos limites de detecção e que permitam um melhor controlo/ monitorização destes compostos, tanto para efluentes de ETAR como para água de consumo humano.

### **4.3 Legislação**

De acordo com um estudo da União Europeia, 118 substâncias foram classificadas como potenciais EDC. Desta lista fazem parte os compostos em estudo neste trabalho, nomeadamente, EE<sub>2</sub> e o E<sub>2</sub> (Auriol *et al.*, 2006).

Para esclarecer, desenvolver estratégias e solucionar o problema dos EDC, várias organizações governamentais e não-governamentais, como a União Europeia (UE), Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), têm vindo a desenvolver programas e planos de pesquisa sobre o tema da desregulação endócrina (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007). Mostram-se na tabela 4.1 alguns destes estudos.

Ainda para um melhor acompanhamento deste assunto, a União Europeia formou uma equipa (COMPREHEND) que tem como principal função avaliar a estrogénicidade e presença



de EDC numa vasta gama de tratamentos de água residual em vários países europeus. Os objectivos da COMPREHEND incluem:

- Determinar a concentração de estrogénios naturais como o E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> e o derivado sintético EE<sub>2</sub> no efluente do tratamento de água residual.
- Analisar quais os parâmetros de tratamento de água residual que mais podem influenciar a remoção de EDC (Johnson *et al.*, 2005).

**Tabela 4.1 - Resumo histórico dos programas sobre EDC (adaptado de Bila e Dezotti, 2007)**

Ano	Organização	Objectivos
1995	Agência Ambiental Federal Alemã	Discussão sobre a ocorrência e impacte dos EDC e potenciais riscos que podem causar aos humanos e outros animais
1995	US EPA	Seminário para avaliar os riscos na saúde e efeitos ambientais dos EDC
1995	Ministério do ambiente e energia da Dinamarca	Avaliação dos efeitos de substâncias estrogénicas no desenvolvimento e nas funções do sistema reprodutivo masculino
1996	US EPA	Seminário para o desenvolvimento de estratégias para avaliar o risco dos EDC no ambiente
1996	US EPA	Desenvolvimento de programa de testes e análises para avaliar a acção dos EDC
1997	US EPA	Relatório sobre os EDC presentes no ambiente
1998	US EPA	Relatório e discussão das informações científicas disponíveis sobre os EDC
1998	OCDE	Desenvolvimento de métodos de ensaio para os EDC
1999	CSTEE	Revisão da literatura existente e opinião científica nas evidências dos EDC, em particular, avaliação dos riscos ecológicos e directrizes de ensaios toxicológicos
1999	Comissão Europeia	Identificação do problema dos EDC, as suas causas, consequências e definição das medidas adequadas para dar uma resposta ao problema
2001	Comissão Europeia	Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da Comunidade Europeia sobre os EDC
2002	Comissão Europeia	Programa COMPREHEND: avaliação das evidências dos EDC no ambiente aquático na Europa
2002	OCDE	Avaliação dos métodos de ensaios para as substâncias estrogénicas
2002	OMS	Avaliação global do estado da arte da ciência dos EDC
2003	IEH	Relatório da avaliação do progresso internacional da pesquisa dos EDC
2004	Comissão Europeia	Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos sobre os EDC

O efeito dos EDC é considerado como um indicador de poluição, mas nenhum método universal é proposto para avaliar esse efeito, o que explica a falta de legislação específica nessa perspectiva (Janex-Habibi *et al.*, 2009). A análise química de compostos simples, não é representativa do efeito geral dos EDC, que se demonstra ser bastante complexo e cujo resultado global é muito difícil de prever. Actualmente, de forma a ultrapassar este problema, a abordagem é feita de forma directa, tendo em conta as NQA (Normas de Qualidade Ambiental) que estão incluídas na regulamentação europeia (Directiva 2008/105/CE).

#### **4.4 Sistema Endócrino**

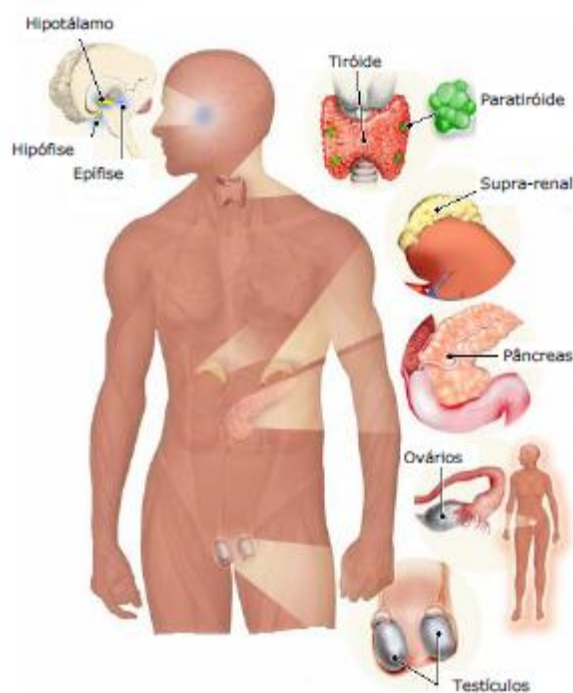
O sistema endócrino (do grego *endos*, dentro, e *krynos*, secreção) é formado por um conjunto de glândulas produtoras de hormonas, muitas das quais reguladas por hormonas tróficas (estimuladoras) segregadas pela hipófise, que estabelece a ligação entre o sistema endócrino e o sistema nervoso (hipotálamo) (Henriques, 2008). É uma complexa rede de sinais e mensagens químicas que coordena e regula a comunicação entre as células, constituído por combinações de glândulas e hormonas, sendo responsável pelas funções biológicas normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo, interagindo directamente com o sistema nervoso (Reis Filho *et al.*, 2006; Henriques, 2008).

A diversidade de glândulas e de tipos de hormonas é elevada, desempenhando um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento, na reprodução e na diferenciação sexual e ainda na formação do sistema nervoso e imunológico (Henriques, 2008). As hormonas são mensageiras químicas que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células. Depois da aproximação e interacção (hormona-receptor) ocorre uma série de reacções bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas (Reis Filho *et al.*, 2006).

As hormonas sexuais são produzidas no organismo, podendo ser classificadas em três grupos principais: hormonas sexuais femininas, ou estrogénios; hormonas sexuais masculinas, ou

androgénios e, hormonas da gravidez, ou progestogénios (Guyton e Hall, 2006; Reis Filho *et al.*, 2006; Campani *et al.*, 2010).

A figura 4.1 mostra o sistema endócrino humano.

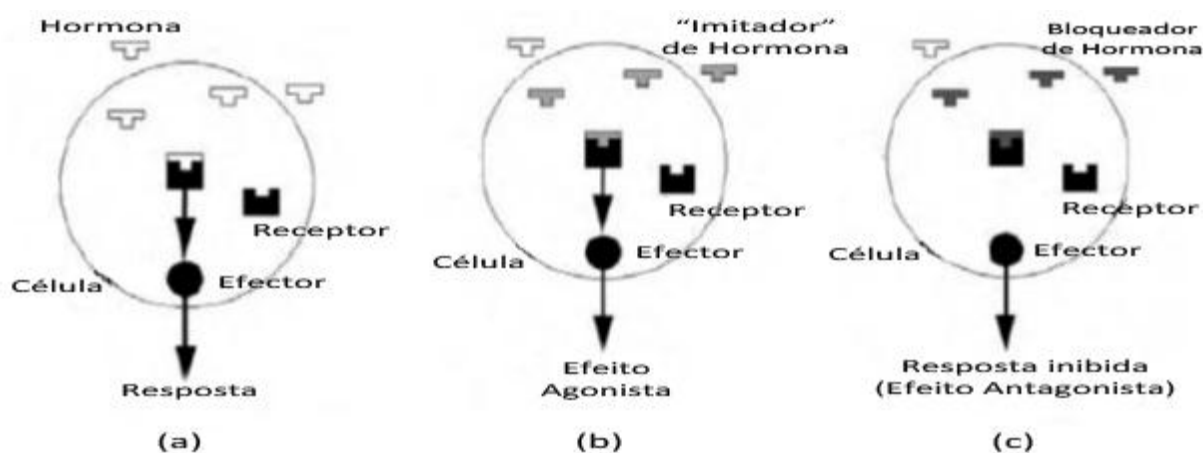


**Figura 4.1 - O sistema endócrino humano. Representação do sistema masculino e feminino (Henriques, 2008)**

O crescimento humano, isto é, o desenvolvimento da capacidade de coordenação e maturação implica uma complexa interação de sinais hormonais cuja cronologia e dose pode ter consequências permanentes sobre a futura forma e função de vários tecidos (Auriol *et al.*, 2006). A variação da concentração destas substâncias, mesmo a concentrações muito baixas, no organismo pode alterar funções e características de órgãos e sistemas, principalmente em períodos críticos do crescimento e de formação dos órgãos e tecidos, uma vez que a fase embrionária é particularmente vulnerável a flutuações hormonais, podendo resultar em alterações de carácter permanente nos seres vivos, que não são visíveis na fase adulta, quando expostos às mesmas concentrações (Auriol *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008). Uma vez que o desenvolvimento dos sistemas reprodutivos feminino e masculino ocorre na fase fetal, as anomalias podem estar relacionadas ao aumento da exposição de substâncias estrogénicas *in utero* (Bila e Dezotti, 2007).

Considerando que os organismos podem ser considerados como um imenso complexo de reacções químicas ininterruptas, desde o zigoto, o embrião, o feto, a fase jovem e, finalmente, a idade adulta, não é surpreendente que uma ampla gama de substâncias possa interferir no sistema endócrino, nomeadamente hormonas naturais, hormonas de síntese e os compostos utilizados ou eliminados pela agricultura e indústria e produtos ou bens de consumo (Auriol *et al.*, 2006; Reis Filho *et al.*, 2006; Henriques, 2008).

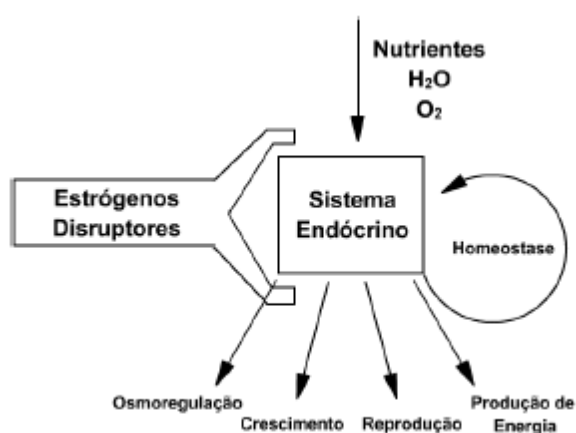
Ao longo da evolução dos seres vivos, as reacções são constantemente alteradas à medida que inúmeros agentes químicos que entram no sistema, como alimentos, bebidas, medicamentos, etc. (Reis Filho *et al.*, 2006). Estes são diversos grupos de substâncias que podem apresentar alguma semelhança com a estrutura química do E<sub>2</sub>, mas causam respostas agónicas e antagónicas, possivelmente através de mecanismos de acção via receptores hormonais, como é possível verificar na figura 4.2.



**Figura 4.2 - Desregulação Endócrina. (a) Resposta Natural; (b) Efeito Agonista; (c) Efeito Antagonista**  
(adaptado de Birket e Lester, 2003)

A actividade agonista consiste na capacidade de uma substância se acoplar ao receptor de estrogénio e originar uma resposta. Em contrapartida, a actividade antagonista constitui a habilidade de uma substância se acoplar ao receptor de estrogénio e bloquear a acção do ligante natural (estrogénio) e, assim, sua resposta não será clara. Essas substâncias podem

ser identificadas pela sua capacidade de perturbar o funcionamento do sistema endócrino mimetizando as hormonas naturais, bloqueando os receptores numa célula, activando a síntese e a secreção de hormonas naturais, desactivando enzimas responsáveis pela secreção de hormonas e/ou estimulando a capacidade das hormonas em interagir com os receptores celulares. (Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008). A figura 4.3 mostra a acção dos estrogénios sobre os mecanismos de controlo do sistema endócrino, desencadeando perturbações em cada um dos aspectos controlados pelo sistema, incluindo a homeostasia que é fundamental para manutenção do equilíbrio metabólico dos organismos.



**Figura 4.3 - Mecanismos de acção dos EDC sobre o sistema endócrino (Reis Filho *et al.*, 2006)**

Os efeitos desencadeados pelas hormonas presentes no ambiente atingem desde micro invertebrados até grandes vertebrados, sendo amplamente relatados na literatura científica e considerados como uma questão de âmbito global. Alguns exemplos desses efeitos passam por alterações nas taxas de fecundação, fertilização, eclosão; modificações comportamentais (agressividade, movimentação); histopatologias (fígado, gónadas, rins); imunodepressão; *imposex* (caso específico dos moluscos) e inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais e reversão sexual, que consiste no desenvolvimento de características sexuais femininas em machos ou o inverso (Auriol *et al.*, 2006; Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007). O sucesso na reprodução é uma característica fundamental da sustentabilidade das espécies. Portanto, os mecanismos que controlam a reprodução são alguns dos processos fisiológicos

mais cuidadosamente coordenados e rigidamente controlados, principalmente nas espécies aquáticas (Tilton *et al.*, 2002).

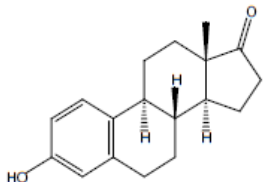
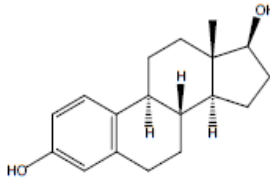
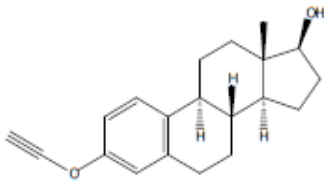
#### **4.5 Hormonas Naturais e Sintéticas**

Os EDC englobam diversos grupos de substâncias com estruturas distintas entre si.

Os esteróides são um grande grupo de compostos solúveis em gordura, que têm uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si. São amplamente distribuídos nos organismos vivos e incluem as hormonas sexuais, a vitamina D e os esteróis (Campani *et al.*, 2010). Entre as hormonas sexuais, os estrogénios recebem maior atenção nas áreas da saúde e ambiental por serem compostos extremamente activos biologicamente e estarem relacionados à etiologia de vários tipos de cancros. As hormonas naturais E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, e o sintético EE<sub>2</sub>, destacam-se por possuírem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados, tanto pela potência estrogénica como pela quantidade contínua introduzida no ambiente (Liu *et al.*, 2005; Reis Filho *et al.*, 2006; Campani *et al.*, 2010).

Na tabela 4.2, mostram-se as principais características dos compostos em estudo neste trabalho.

**Tabela 4.2 - Propriedades físico-químicas dos EDC em estudo (adaptado de Reis Filho *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008)**

Nome	Estrona (E <sub>1</sub> )	17β-estradiol (E <sub>2</sub> )	17α-etinilestradiol (EE <sub>2</sub> )
Estrutura			
CAS – nº	53-16-7	50-28-2	57-63-6
Peso Molecular	270,37	272,39	296,41
Fórmula Molecular	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Solubilidade (mg/l)	0,8-12,4	3,85	19,1
log K <sub>OW</sub>	3,43	4,01	3,67
pK <sub>a</sub>	10,34	10,23	10,21
γ <sub>SAT</sub> (μg/l 25 °C)	12420	12960	483
Pressão de vapor (mm Hg)	2,3x10 <sup>-10</sup>	2,3x10 <sup>-10</sup>	4,5x10 <sup>-11</sup>
K <sub>OC</sub>	4882	3300	4770
Meia-vida (dias)	2-3	2-3; 0,2-9	4-6

Como já referido anteriormente, estes compostos são encontrados no ambiente, uma vez que a contaminação da água e dos solos por hormonas naturais e/ou sintéticas ocorre principalmente através da descarga de águas residuais e da actividade agro-pecuária, provenientes da excreção do Homem e de outros animais (Shore e Shemesh, 2003; Henriques, 2008; Diniz *et al.*, 2010).

No Homem, estas hormonas são excretadas, naturalmente e diariamente na urina, sendo quimicamente muito estáveis ou podem ser excretadas na forma livre ou como conjugados (acetatos, sulfatos e glucoronatos). Os microrganismos possuem a capacidade de reactivar estes compostos através de mecanismos de clivagem da sua forma conjugada. Desta forma,

as hormonas naturais, na sua forma activa, podem surgir nos efluentes de ETAR, nas águas superficiais, nas águas subterrâneas e nos solos (Shore e Shemesh, 2003; Braga *et al.*, 2005; Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008).

O destino e comportamento de um EDC são influenciados pelas suas propriedades físico-químicas. Devido a essas propriedades, a maioria dos EDC tendem a favorecer a adsorção a superfícies sólidas. Para avaliar a associação dos EDC com a fase de sólida, são utilizados o coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{OW}$ ) ou o coeficiente de partição carbono-água ( $K_{OC}$ ) (Birkett e Lester, 2003). O  $\log K_{OW}$  é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução num sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis: água e octanol. Isto deve-se ao facto de o  $\log K_{OW}$  estar relacionado com a interacção do composto em estudo com o meio, no que diz respeito à absorção e transporte (Silva e Ferreira, 2003).

A partição entre sedimento e água, tendo em conta as várias condições ambientais, depende principalmente da hidrofilicidade/hidrofobicidade dos compostos (Birkett e Lester, 2003; Reis Filho *et al.*, 2006; Janex-Habibi *et al.*, 2009). No entanto, os fenómenos de transformação ocorrem durante todo o processo. Por exemplo, os estrogénios são excretados como glucuronídeos relativamente instáveis ou outros conjugados persistentes. A desconjugação ocorre parcialmente em águas residuais, mas pode não ser completa na entrada da ETAR, daí a necessidade de considerar as duas formas, livre e conjugada. Devido a sua lipofilicidade e baixa volatilidade ( $\log K_{OW}$  entre 3 e 4), o processo de adsorção em sedimentos suspensos pode ser um factor significativo na redução dos estrogénios na fase aquosa. Contudo, são necessários mais estudos e mais aprofundados de forma a poder-se avaliar a dinâmica de distribuição destes compostos nos diversos ambientes em que estão ou são inseridos (Desbrow *et al.*, 1998; Shore e Shemesh, 2003; Rudder *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Reis Filho *et al.*, 2006; Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Os principais compostos excretados pelos animais são a  $E_1$ , o  $E_2$ , o  $E_3$  e os seus respectivos compostos conjugados. Estas substâncias podem ser introduzidas directamente, nos cursos de água devido a escorrências ou através de efluentes de ETAR, ou indirectamente através



da utilização das fezes animais como fertilizantes, havendo a sua transferência para o solo e, subsequentemente para a água (Furuichi *et al.*, 2006; Henriques, 2008).

Vários estudos mostraram que o E<sub>2</sub>, um dos estrogénios naturais mais estudado e utilizado, já provoca alterações, no sistema endócrino, quando presente em concentrações na ordem dos ng/l, enquanto a maioria dos outros produtos químicos que possuem um efeito estrogénico, são biologicamente activos apenas quando presentes em concentrações na ordem dos µg/l. Estas alterações consistem na interferência na síntese, secreção, transporte, ligação, acção ou eliminação de hormonas naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e comportamento dos organismos (Purdom *et al.*, 1994; Bila e Dezotti, 2007; Cirja *et al.*, 2008; Chen e Hu, 2009).

Pelas razões já referidas, foram surgindo dúvidas sobre a presença de EDC em efluentes de águas residuais, levantando a preocupação com a qualidade das águas dos meios receptores, devido aos prováveis impactes estrogénicos no Homem e animais (domésticos e selvagens) (Huang e Sedlak, 2001; Li *et al.*, 2005). Actualmente, estes compostos têm sido identificados e quantificados em várias ETAR, principalmente nos países desenvolvidos (Huang e Sedlak, 2001; Lee *et al.*, 2008; Diniz *et al.*, 2010).

#### **4.5.1 Fontes de EDC**

Os desreguladores endócrinos são compostos, como já referido, perturbadores do bom funcionamento do sistema endócrino, tanto no Homem como nos animais. A exposição humana a esses produtos químicos presentes no ambiente é uma preocupação crítica, uma vez que o impacto a longo prazo ainda é desconhecido (Auriol *et al.*, 2008; Duarte, 2008; Liu *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2011).

Assim, e sendo as vias de exposição a estes compostos muito variadas, podendo materializar-se por contacto directo com o ambiente (por exemplo, caminhar sobre um campo que foi pulverizado com pesticidas), pela alimentação (como a ingestão de alimentos contaminados com plastificantes da embalagem), pela ocupação laboral (por exemplo, químicos industriais) e ainda, exposição na habitação (como inalação de compostos voláteis,

de detergentes, produtos farmacêuticos) e indirectamente principalmente através da descarga de efluentes de ETAR, antes de chegar aos meios receptores (solo, águas superficiais, sedimentos e águas subterrâneas), torna-se imperativo que o seu estudo seja aprofundado, principalmente os sistemas de tratamento e remoção em ETAR.

Além de estarem associados a efeitos no sistema endócrino, alguns são também persistentes, lipofílicos, bioacumulativos e têm baixa pressão de vapor, o que facilita a dispersão e difusão no ambiente, dificultando, por isso a sua remoção (Bila e Dezotti, 2007; Auriol *et al.*, 2008; Duarte, 2008; Liu *et al.*, 2009; Wise *et al.*, 2011).

Como já referido anteriormente, alguns agentes terapêuticos e farmacêuticos também estão incluídos na lista das substâncias classificadas como desreguladores endócrinos. São exemplo, os estrogénios naturais ( $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ ) e os sintéticos (DES e  $EE_2$ ) usados em grandes quantidades para fins medicinais, como os contraceptivos orais, na reposição terapêutica na menopausa ou na prevenção do aborto (Huang e Sedlak, 2001; Holbrook *et al.*, 2004; Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Stumpe e Marschner, 2007; Wise *et al.*, 2011).

Embora existam muitas versões diferentes de contraceptivos orais, a maioria destes são uma combinação de estrogénio e progesterona, sendo o  $EE_2$  o estrogénio mais utilizado no desenvolvimento de pílulas contraceptivas, que contêm de 30 a 50  $\mu\text{g}$  de  $EE_2$  por pílula, com 11,6 milhões de mulheres em idade reprodutiva a usar este tipo de contraceptivos nos EUA e um consumo de cerca de 40 kg/ano na França (Gabet-Giraud *et al.*, 2010). Segundo Zlidar *et al.* (citado por Reis Filho *et al.*, 2006), mais de 620 milhões de mulheres casadas em todo o mundo utilizam métodos contraceptivos, estando as pílulas anticoncepcionais entre os mais utilizados. O uso de contraceptivos orais permite às mulheres um nível significativo de liberdade reprodutiva. No entanto, após o tratamento de águas residuais, são detectados estrogénios (embora em baixas concentrações) provenientes do principal composto dos contraceptivos orais, o  $EE_2$ . Este composto é ainda encontrado em águas de superfície, causando alguma preocupação com a contaminação dos meios aquáticos (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Gabet-Giraud *et al.*, 2010; Wise *et al.*, 2011). Na tabela 4.3 mostra-se o uso de estrogénios em produtos farmacêuticos.

Tabela 4.3 - Uso de estrogénios em produtos farmacêuticos (adaptado de Wise *et al.*, 2011)

Usos farmacêuticos de estrogénios	Tratamento	Estrogénios activos
Contraceptivos orais	Inibição de ovulação	17 $\alpha$ -etinilestradiol
Terapia de reposição hormonal	Menopausa, osteoporose	Estrogénios conjugados
Medicação contra o cancro	Cancro da mama e da próstata	DES, Tamoxifen
Medicina veterinária	Promoção do crescimento	17 $\beta$ -estradiol e Zeranol

Conforme se referiu, existem várias fontes de EDC que contribuem para a contaminação do ambiente, afectando, tanto o Homem como os restantes organismos. Na figura 4.4 mostra-se um diagrama dos vários pontos de entrada no meio aquático para os produtos químicos estrogénicos adaptado de Liu *et al.*, 2009 e Wise *et al.*, 2011.

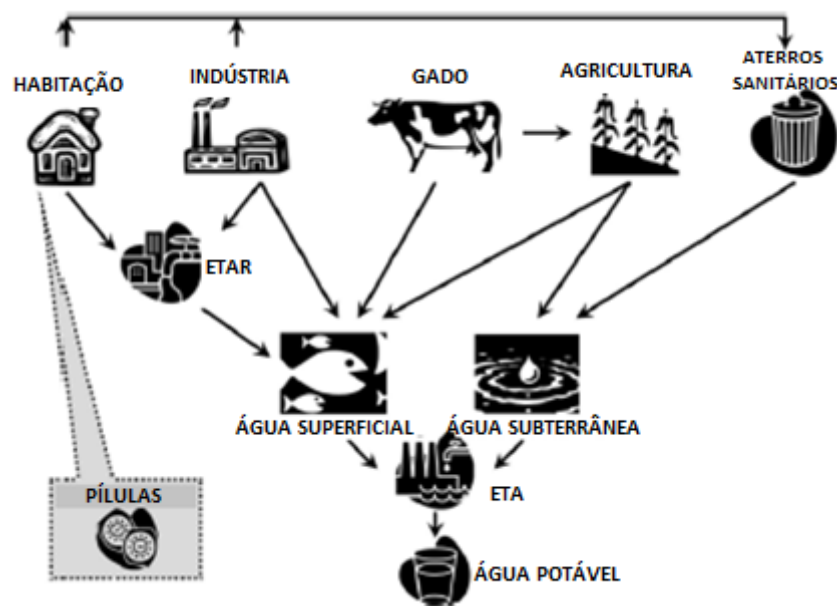


Figura 4.4 - Esquema dos vários pontos de entrada dos estrogénios naturais e sintéticos (adaptado de Liu *et al.*, 2009 e Wise *et al.*, 2011)

O corpo humano apresenta três estrogénios naturais: E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>, a estrutura do estrogénio sintético EE<sub>2</sub> é mais semelhante à estrutura do E<sub>2</sub>. A sua principal diferença é a sua longa persistência no ambiente, com um tempo de dissipação da ordem de 20-40 dias em ambientes aquáticos de água doce. Para além desse facto, o EE<sub>2</sub> é conhecido como sendo um estrogénio extremamente potente e a sua forte estrogenicidade foi verificada em estudos *in vitro* e *in vivo* (Rudder *et al.*, 2004; Wise *et al.*, 2011). Contudo e felizmente, na

grande maioria dos casos, o EE<sub>2</sub> apenas está presente em pequenas concentrações (na ordem dos ng/l) nos efluentes de ETAR.

A potência dos estrogénios é, habitualmente, medida em relação à potência do estrogénio E<sub>2</sub> (tendo este o valor de 1) e estima-se que possuam as seguintes potências relativas: EE<sub>2</sub>: 2,0; E<sub>2</sub>: 1; E<sub>1</sub>: 0,2-0,4; E<sub>3</sub>: 0,024-0,026. Estes valores foram determinados por um receptor de estrogénio utilizado em ensaios *in vitro* ou através da indução de VTG em peixes masculinos jovens. Por estas razões, vários cientistas alegam que o EE<sub>2</sub> tem possivelmente o maior impacto individual na estrogenicidade dos efluentes e deve ser considerado o EDC mais preocupante (Rudder *et al.*, 2004; Wise *et al.*, 2011).

Na figura 4.5 mostra-se a contribuição estimada da excreção total de estrogénios naturais (E<sub>1</sub> + E<sub>2</sub> + E<sub>3</sub>) e do estrogénio sintético EE<sub>2</sub>.

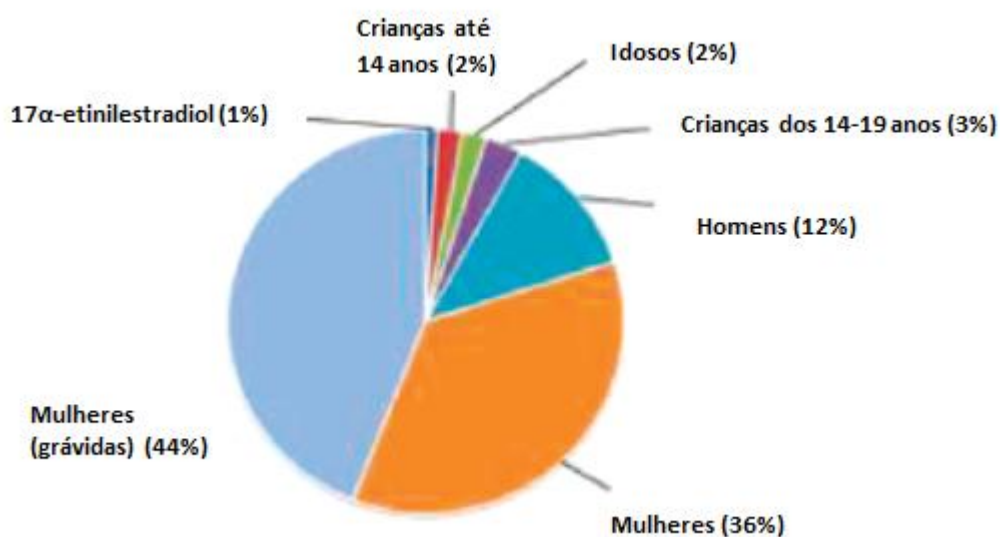


Figura 4.5 - Contribuição estimada da excreção total de estrogénios naturais (E<sub>1</sub> + E<sub>2</sub> + E<sub>3</sub>) e do estrogénio sintético EE<sub>2</sub> pelo Homem (adaptado de Wise *et al.*, 2011)

As quantidades de hormonas excretadas pelo Homem variam em função do sexo e da condição fisiológica. E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub> são estrogénios endógenos excretados pelas mulheres em quantidades que variam de 10 a 100  $\mu$ g/dia e até 30  $\mu$ g/dia por mulheres grávidas. Outro

composto excretado é o EE<sub>2</sub>, que está presente em muitos contraceptivos sintéticos, e que é usado em doses orais diárias variando entre 25 a 50 µg (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008; Campani *et al.*, 2010).

Na tabela 4.4 mostra-se a excreção diária (µg) *per capita* de estrogénios pelo Homem.

**Tabela 4.4 - Excreção diária (µg) *per capita* de estrogénios pelo Homem (adaptado de Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Campani *et al.*, 2010)**

<b>Categoria</b>	<b>Estrona</b>	<b>17β-estradiol</b>	<b>Estriol</b>	<b>17α-etinilestradiol</b>
<b>Homem</b>	39	1,6	1,5	-
<b>Mulheres em período fértil</b>	8	3,5	4,8	3,5
<b>Mulheres na menopausa</b>	4	2,3	1	-
<b>Mulheres grávidas</b>	600	259	6.000	-

Para além do Homem, alguns animais têm alguma influência também na excreção de estrogénios para o ambiente. Estas excreções afectam a qualidade da água superficial e subterrânea. A quantidade de estrogénios libertados por animais varia consoante a espécie em causa e o tipo produção. Alguns investigadores relataram a presença de E<sub>2</sub> (de 6 a 66 ng/l) em águas subterrâneas próximas a áreas com alta densidade de criação de animais. Os estrogénios são naturalmente excretados pelos animais, ou são administrados como estimulante da fertilização (Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008).

Na tabela 4.5 mostra-se a excreção diária de estrogénio total estimada por diferentes espécies de animais.

**Tabela 4.5 - Excreção diária de estrogénio total estimada por diferentes espécies de animais (µg/dia)  
(adaptado de Wise *et al.*, 2011)**

<b>Gado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Total de estrogénios excretados pela urina (µg/dia)</b>	<b>Total de estrogénios excretados pelas fezes (µg/dia)</b>	<b>Total de estrogénios excretados por dia (µg)</b>	<b>Cabeças de gado (EUA) (milhões)</b>
<b>Bovino</b>	Bezerros	15	30	45	17
	Vacas	99	200	299	20
	Prenhes	320 - 104 320	256 - 7 300	576 - 111 620	43
<b>Suíno</b>	Porcos	82	21	103	-
	Prenhes	700 - 17 000	61	-	-
<b>Ovino</b>	Ovelhas	3	20	23	2.5
	Carneiros	3	22	25	0.6

A excreção anual de estrogénios por animais, incluindo bovinos, porcos, ovelhas e galinhas, foi estimada em 39 toneladas na União Europeia e 41 toneladas nos Estados Unidos. As concentrações de E<sub>2</sub> em lagos que recebem escoamentos bovinos variam entre 0,05 - 7,4 ng/l; essas concentrações podem provocar efeitos sobre a reprodução normal de várias espécies, como o caso das tartarugas presentes nesses lagos (Furuichi *et al.*, 2006).

A maioria dos estrogénios excretados nas fezes de bovinos ocorre no último trimestre da gestação e quase todo o E<sub>2</sub> e estrona encontram-se na forma livre. A contribuição de urina onde o estrogénio está presente, principalmente na forma de conjugados, para o total estrogénios excretados, é geralmente inferior a 20%. No entanto, estes conjugados convertem-se rapidamente para a forma livre activa após a excreção. Calcula-se que uma vaca prenhe excrete 0,76 g de estrogénio por gestação (Shore e Shemesh, 2003).

Os principais estrogénios excretados pelas galinhas são a E<sub>1</sub> e o E<sub>2</sub>. A excreção urinária de estrogénio em galinhas poedeiras e não poedeiras foi de cerca de 3 e 0,5 µg/d para E<sub>1</sub> e 3 e 2 µg/d para o E<sub>2</sub>, respectivamente (Shore e Shemesh, 2003).

Para além dos animais, existem hormonas naturais provenientes de plantas que podem entrar na cadeia alimentar, os denominados de fitoestrogénios. Alguns exemplos são os

grãos integrais, ervilhas, feijão, alguns vegetais e frutas, a soja e os alimentos baseados em soja, como tofu. Os fitoestrogénios são compostos naturais mais fracos que os estrogénios endógenos. O consumo médio de estrogénios, por adultos, em alimentos tem sido calculado em 0,1 µg/dia, o que é bastante reduzido em comparação com uma produção endógena humana. Para além dos alimentos já mencionados, outras fontes destes compostos são os produtos de carne e leite. Estas substâncias podem acoplar-se aos receptores estrogénicos e podem funcionar como agonistas ou antagonistas no sistema endócrino (Shore e Shemesh, 2003; Bila e Dezotti, 2007; Wise *et al.*, 2011).

#### **4.5.2 Efeitos dos EDC**

Os riscos potenciais dos desreguladores endócrinos têm sido tema de vários debates internacionais e pesquisas científicas. Na verdade, a informação sobre um possível papel negativo destes compostos na saúde de animais selvagens e seres humanos continua a crescer. No entanto, é necessário haver investigação mais exaustiva para se determinar a partir de que nível a contaminação provocada por desreguladores endócrinos pode provocar efeitos danosos no ambiente (Rudder *et al.*, 2004; Bila e Dezotti, 2007).

Tal como já foi referido, a alteração ou desregulação endócrina pode estar associada a interferências na síntese, secreção, transporte, ligação e acção ou eliminação das hormonas naturais do organismo, conduzindo a uma resposta hormonal diferente, a qual resulta num sinal errado para o organismo. Esta desregulação do sistema endócrino tem sérias implicações nos seres vivos, as quais podem ser patológicas. Nos seres humanos, por exemplo, houve um aumento de casos documentados de cancro da mama, testicular e da próstata, bem como disfunções imunológicas e neurológicas nos seres humanos, tais como o aumento do número de relatórios sugerindo a diminuição da qualidade do sémen, criptorquidia (testículos que não desceram), hipospadia (malformação do pénis) e ovários policísticos. Entre os animais selvagens, tem havido muitos relatos de diminuição das populações, o número de cancros aumentou, redução da função reprodutiva e perturbações no desenvolvimento dos sistemas imunitário e nervoso (Rudder *et al.*, 2004; Schiliró *et al.*, 2004; Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008; Chen e Hu, 2009).

Entretanto, como é possível verificar pelo número de publicações, os efeitos negativos para a saúde humana e de outras espécies de animais são um facto. Pode mencionar-se a exposição ao DDT e DDE dos jacarés na Flórida, que desenvolveram anomalias no sistema reprodutivo e o desenvolvimento de anomalias no sistema reprodutivo de mulheres que foram expostas *in utero* ao DES (Bila e Dezotti, 2007; Henriques, 2008).

Parte desses estudos concluiu que alguns destes compostos ( $E_1$ ,  $E_2$  e  $EE_2$ ) podem ter alta actividade estrogénica mesmo em concentrações extremamente baixas (Purdom *et al.*, 1994; Bila e Dezotti, 2007; Cirja *et al.*, 2008; Chen e Hu, 2009). Dependendo da dose de exposição, os EDC são responsáveis por vários efeitos adversos na vida selvagem, por exemplo, a feminização de peixes machos, masculinização de caracóis (Desbrow *et al.*, 1998; Körner *et al.* 2000), inibição do crescimento, a imobilidade, mutagenicidade, um acréscimo da mortalidade precoce e nidificação com elementos do mesmo sexo entre determinado tipo de aves (exemplo, gaivotas), ressurgimento de casos de pseudohermafroditismo ou *imposex* em muitas espécies marinhas (exemplo, gastrópodes), malformações ao nível genital em répteis (exemplo, crocodilos), para além do declínio e extinção de diversas espécies costeiras (exemplo, ostras) e as alterações na densidade populacional (Schiliró *et al.*, 2004; Cirja *et al.*, 2008; Henriques, 2008).

Como já foi referido anteriormente, foram encontrados efeitos em peixes que habitam zonas de descarga de águas residuais. A maioria destes peixes possuía níveis elevados de VTG e uma elevada prevalência de *intersex* (Johnson *et al.*, 2000; Birkett e Lester, 2003; Servos *et al.*, 2005; Auriol *et al.*, 2006). Estes efeitos têm consequências importantes nas espécies destes peixes, uma vez que ao haver mais fêmeas do que machos, o número de descendentes diminui. A diminuição destes pode levar à extinção da espécie, tendo em conta que a sua captura não está equilibrada com o nascimento de novos peixes. A extinção da espécie, por seu lado, pode levar a problemas económicos em algumas regiões, que vivam essencialmente da pesca. (Johnson *et al.*, 2000; Duarte, 2008)

No estudo de Routledge *et al.* (citado por Bila e Dezotti, 2007), duas espécies de peixes, *Oncorhynchus mykiss* e *Rutilus rutilus*, foram expostas por 21 dias a concentrações de  $E_1$  e  $E_2$  ambientalmente relevantes (1, 10, 100 ng/l). De acordo com estes investigadores, os



resultados confirmaram que os estrogénios identificados em efluentes domésticos estão presentes em quantidades suficientes para induzir a síntese de VTG em espécies de peixes. Os efluentes de ETAR têm sido apontados como a maior causa de efeitos estrogénicos em peixes. Larsson *et al.* (1999) e Rodgers-Gray *et al.* (2000) observaram um aumento nos níveis de VTG no plasma de peixes da espécie *Rutilus rutilus* quando expostos ao efluente de ETAR no Reino Unido. Neste efluente foi detectada a presença dos estrogénios E<sub>2</sub>, E<sub>1</sub> e EE<sub>2</sub> nas concentrações de 4,50, 1,7 e 3,4 ng/l, respectivamente (Rodgers-Gray *et al.*, 2000).

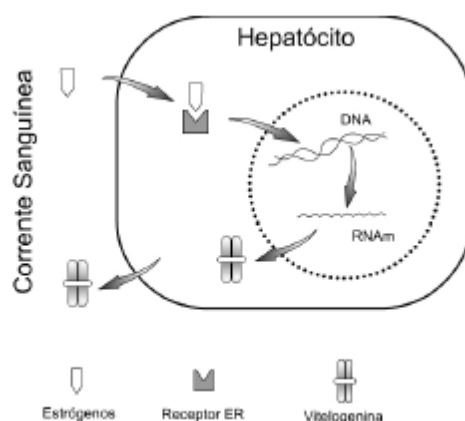
No entanto, também existem peixes e moluscos que acumulam estes compostos no seu organismo, assim como outros animais, chegando ao ser humano através da alimentação, podendo ter um efeito cumulativo com consequências mais negativas para a saúde. Para além dos efeitos referidos a descarga de águas residuais parcialmente tratadas contribui para a poluição das massas de água e com interferência directa em água utilizadas para produção de água para consumo humano. Quando estes compostos são identificados nestas massas de água dever-se-ia adoptar um tratamento mais exigente e adaptado à remoção quase total destes compostos (Duarte, 2008).

#### 4.5.3 Vitelogenina (VTG)

A vitelogenina é uma proteína complexa, precursora para a produção de vitelo em todos os vertebrados ovíparos e é sintetizada pelo fígado em resposta aos estrogénios endógenos. Nos peixes, a vitelogenina é normalmente encontrada no sangue de fêmeas em estado de maturação, enquanto os níveis desta proteína em peixes machos, jovens ou adultos, são muito reduzidos. O indutor natural da síntese de vitelogenina é o E<sub>2</sub>, no entanto, muitos dos chamados estrogénios ambientais também induzem a síntese de vitelogenina em machos e fêmeas. O potencial da VTG como biomarcador já foi demonstrado em várias espécies de peixes. A indução da síntese de VTG não ocorre só em espécies de peixes, mas também em outras espécies de animais. Concentrações ambientalmente relevantes de E<sub>2</sub> são suficientes para induzir a síntese de VTG em tartarugas e em mexilhões (*Elliptio complanata*). Espécies de jovens jacarés que viveram em lagos da Flórida poluídos apresentaram anomalias no sistema reprodutivo, tais como, concentrações anormais de hormonas sexuais no plasma (baixa concentração de testosterona) e anomalias morfológicas nas gónadas (redução no

tamanho do pênis). Assim, a VTG tem sido utilizada como um biomarcador ideal para medir a exposição de animais ovíparos a estrogénios ou a compostos que imitam esses estrogénios. Os biomarcadores são quaisquer respostas biológicas decorrentes de reacções químicas medidas em nível sub-individual, tanto dentro do organismo (enzimas, proteínas, hormonas, aminoácidos, material genético) como em seus produtos (urina, fezes, pêlos), indicando um desvio das condições normais não detectadas em organismos intactos (Larsson *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2005; Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Diniz *et al.*, 2010).

A VTG é uma fosfolipoglicoproteína sintetizada por todas as fêmeas de ovíparos durante o ciclo reprodutivo; é produzida no fígado e secretada na corrente sanguínea, onde é transportada até os ovários, acumulando-se nos oócitos em crescimento para ser utilizada como precursora das reservas nutricionais necessárias para o desenvolvimento subsequente dos embriões. Em indivíduos imaturos ou em machos, a codificação do gene para esta proteína não existe, ou é muito fracamente expressada. Assim, a presença desta proteína no sangue destes organismos representa um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de estrogénios (figura 4.6) (Reis Filho *et al.*, 2006).



**Figura 4.6 - Representação esquemática simplificada da sequência de processos que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos (Reis Filho *et al.*, 2006)**

Além de proporcionar uma avaliação qualitativa de exposição a agentes estrogénicos, a própria produção da VTG no género masculino envolve efeitos negativos, ainda que indirectos, para o desenvolvimento dos organismos. A sobrecarga das funções hepáticas e a disrupção metabólica, devido ao desvio na produção de proteínas essenciais em detrimento da produção da VTG, juntamente com a baixa na resistência imunológica e retardo no crescimento, são alguns dos possíveis efeitos registados (Reis Filho *et al.*, 2006).



## 5 Métodos e Técnicas de Detecção de EDC

### 5.1 Relevância dos Métodos e Técnicas de Detecção

A presença de EDC e por sua vez dos estrogénios naturais e sintéticos no ambiente, pode perturbar os ecossistemas e a saúde humana. A União Europeia (EU), a Agência de Protecção Ambiental Norte-Americana (US EPA), a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), evidenciam preocupações com relação à acção negativa provocada pelos desreguladores endócrinos. Assim, a necessidade de desenvolver métodos sensíveis e fiáveis de detecção, ferramentas de análise e processos de tratamento de água residual é, actualmente, matéria de estudo nas comunidades científicas. (Belfroid *et al.*, 1999; Auriol *et al.*, 2006; Veras, 2006; Cirja *et al.*, 2008)

Os métodos analíticos mais modernos permitem a determinação de substâncias complexas, assim como uma vasta gama de produtos farmacêuticos, produtos para cuidados pessoais, estrogénios e vários EDC em diversos tipos de águas naturais, presentes em concentrações muito baixas (na ordem dos  $\mu\text{g/l}$  e  $\text{ng/l}$ ), em diversas matrizes ambientais, tais como águas naturais, solo, sedimentos, lamas biológicas e efluentes de ETAR. Contudo, continuam a ser desenvolvidas novas técnicas para melhorar os processos já existentes, bem como se tem procurado desenvolver novos métodos, de maneira a que seja possível a obtenção de melhor informação acerca do comportamento e transformação destes compostos na água (Ternes *et al.*, 1999a; Vanderford *et al.*, 2003; Bila e Dezotti, 2007; Liu *et al.*, 2009; Roque, 2009).

## 5.2 Técnicas Cromatográficas

Em relação aos métodos analíticos de separação, destacam-se as técnicas cromatográficas, que são métodos físicos usados para separar e/ou analisar misturas constituídas por diversos tipos de compostos.

Os compostos a serem separados nas técnicas cromatográficas são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel que percorre o leito estacionário. Esta técnica ocorre como resultado de processos repetidos de adsorção e desorção durante o movimento dos componentes da amostra, em diferentes velocidades de migração, através dos materiais constituintes da fase estacionária, promovendo dessa forma a separação. A distinção entre os principais métodos cromatográficos é feita em termos das propriedades da fase móvel, que pode ser líquida (LC) ou gasosa (GC) (Veras, 2006; Pombeiro, 2003).

A determinação de  $E_2$  e  $EE_2$  no ambiente requer técnicas de análise bastante sensíveis e selectivas, devido às suas baixas concentrações. Actualmente, técnicas cromatográficas tais como a cromatografia líquida (*liquid chromatography* (LC)), a cromatografia líquida de alta-eficiência (*high-performance liquid chromatography* (HPLC)) e a cromatografia gasosa (*gas chromatography* (GC)) são as mais utilizadas. Um detector apropriado constitui um elemento indispensável de um instrumento analítico. No caso da LC, da HPLC e da GC, a espectrometria de massa (*mass spectrometry* (MS)) é o mais utilizado. Infelizmente, os métodos espectrométricos estão associados a instrumentação cara e requerem pessoal altamente especializado, impedindo a aplicação destes métodos de uma forma mais ampla (Hintemann *et al.*, 2006; Trenholm *et al.*, 2006; Cirja *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Roque, 2009).

Assim, de forma a melhorar a análise de estrogénios naturais existentes em matrizes complexas, como é o caso de afluentes e efluentes de águas residuais, é necessária uma análise de cromatografia acoplada à técnica de MS. A MS oferece informações sobre a composição atómica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos, aumentando substancialmente o desempenho dos métodos cromatográficos na identificação de

compostos e aumentando os limites de detecção (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003; Veras, 2006).

Os espectrómetros de massa são dispositivos capazes de classificar iões de acordo com sua relação massa-carga, por meio do movimento destes em campos eléctricos e magnéticos. Desta forma, é possível identificar diferentes compostos, de acordo com o seu comportamento, minimizando possíveis erros de detecção, através de uma análise mais específica de cada composto (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003).

Recentemente tem-se optado pelo arranjo de espectrometrias de massa (MS-MS), pois este promove maior selectividade ao resultado. Nesse caso, o método envolve pelo menos duas fases de análise de massa em conjugação com um processo de dissociação que causa uma mudança na massa ou nos iões. No arranjo mais comum MS-MS o primeiro espectrómetro é usado para isolar um precursor iónico e fragmentá-lo, espontaneamente ou por meio de activação, produzindo produtos iónicos e fragmentos neutros. O segundo espectrómetro analisa o produto iónico resultante. Assim, a massa específica não é apenas quantificada, mas pode ser relacionada a uma fragmentação específica de produtos iónicos (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003).

Na figura 5.1 mostra-se um exemplo de um cromatograma, relativo aos compostos estrogénicos em estudo, através de GC-MS.

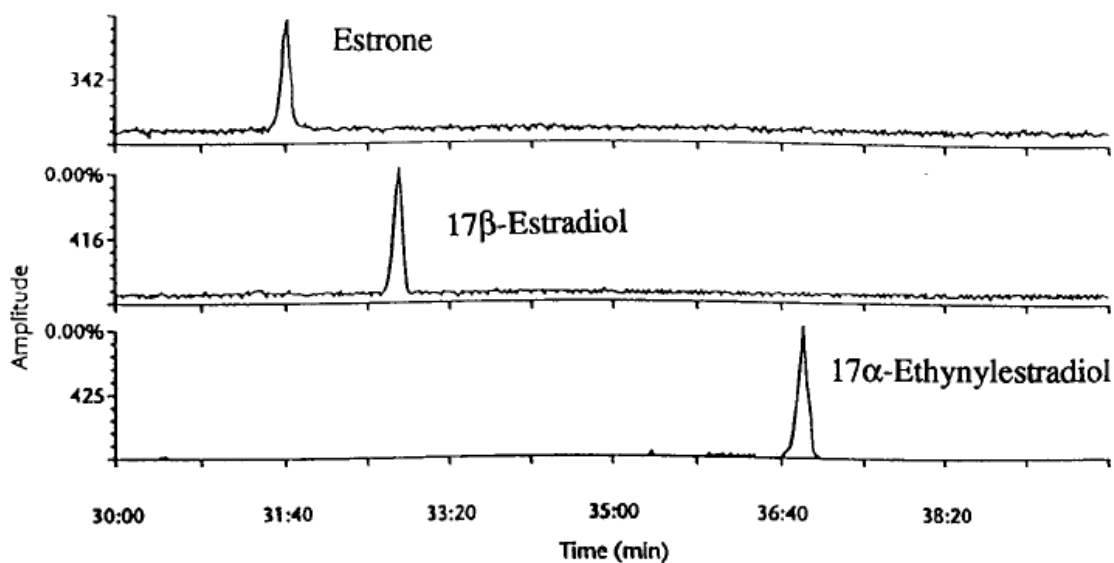


Figura 5.1 - Exemplo de detecção de  $E_1$ ,  $E_2$  e  $EE_2$  através de cromatografia gasosa acoplada a uma espectrometria de massa (adaptado de Desbrow *et al.*, 1998)

### 5.3 Ensaios Biológicos

As técnicas de detecção através de ensaios biológicos têm ganho cada vez mais destaque e, durante os últimos anos, têm-se tornado bastante populares na identificação e quantificação de contaminantes em amostras de água, nomeadamente os estrogénios naturais e sintéticos (Veras, 2006; Bila e Dezotti, 2007).

Desta forma, é de salientar que esta técnica é uma boa alternativa para detecção de EDC em amostras ambientais. Na literatura são mencionados variados tipos de ensaios biológicos, tais como os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA – “*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*”), radioimunoensaio (RIA – “*Radio Immuno Assay*”), ensaio de levedura de estrogénio (YES – “*Yeast Estrogen Screen*”) (Veras, 2006; Bila e Dezotti, 2007; Cirja *et al.*, 2008).

Na tabela 5.1 são apresentadas algumas das vantagens e das desvantagens dos métodos de imunoensaios para amostras ambientais.



**Tabela 5.1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de imunoensaio (adaptado de Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003; Veras, 2006)**

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidade;</li> <li>• Facilidade de utilização;</li> <li>• Necessidade de pequenos volumes de amostra;</li> <li>• Vasta aplicabilidade;</li> <li>• Simples preparação da amostra;</li> <li>• Capacidade de análise de várias amostras em simultâneo;</li> <li>• Adequado para trabalho de campo;</li> <li>• Curto tempo de análise;</li> <li>• Boa relação custo-efectividade;</li> <li>• Ideal para detecção em amostras com altas cargas de poluentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vulnerável a reacções cruzadas;</li> <li>• Detecção imprecisa em amostras com baixas cargas de poluentes;</li> <li>• Quando existem baixas cargas de poluentes, há necessidade de confirmação do resultado através de métodos de separação (como o caso dos métodos cromatográficos);</li> <li>• A síntese de anticorpos pode ser difícil e dispendiosa;</li> <li>• Apenas uma substância específica pode ser analisada.</li> </ul>

O ensaio ELISA é uma das técnicas mais simples de imunoensaio, bastante sensível, envolvendo uma enzima vinculada a um antígeno ou anticorpo como marcador, para a detecção de uma proteína específica (Roque, 2009). Actualmente, encontra-se comercialmente disponível em *kits* para detecção e quantificação de pesticidas, hormonas, entre outras substâncias. Uma outra forma indirecta de detectar estrogénios é por meio da detecção ELISA de biomarcadores, em vez da detecção do próprio EDC. Um biomarcador muito utilizado é a VTG no plasma sanguíneo, tendo em vista que alguns organismos respondem a um aumento na síntese de VTG como resposta à exposição a determinadas concentrações de estrogénio (Huang e Sedlak, 2001; Nogueira, 2003; Bila e Dezotti, 2007).

Na figura 5.2 mostra-se em exemplo de um Leitor de ELISA.

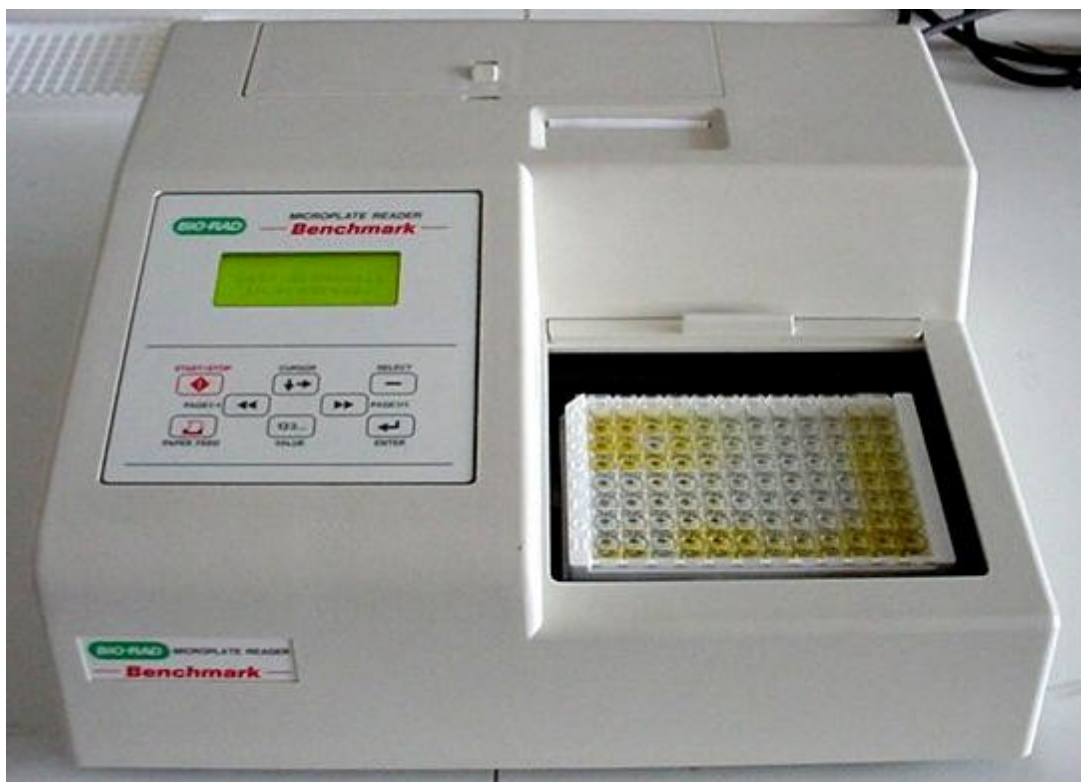


Figura 5.2 - Leitor de ELISA (Maurício, 2008)

#### ***5.4 Comparação dos Métodos de Detecção***

As análises anteriormente referidas (ensaio ELISA e cromatografia) requerem um pré-tratamento das amostras. Este pré-tratamento torna-se necessário devido à complexidade das matrizes biológicas envolvidas, à incompatibilidade de algumas proteínas com as colunas cromatográficas e à concentração presente das substâncias na solução. (Queiroz *et al.*, 2000).

Para a preparação da amostra, a extracção em fase sólida (SPE – “*Solid Phase Extraction*”) é actualmente uma das ferramentas mais poderosas e mais utilizadas para a extracção e pré-concentração de compostos presentes em matrizes complexas (Queiroz *et al.*, 2000). A SPE é uma técnica de extracção simples, rápida e que requer pequenas quantidades de solventes (Bila e Dezotti, 2007). Nesta técnica os grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos são quimicamente ligados a uma superfície sólida, comercialmente disponível em forma de

cartuchos ou discos de extracção, com uma variedade de adsorventes (Reis Filho *et al.*, 2006; Bila e Dezotti, 2007). O adsorvente mais amplamente utilizado é o octadecilsilano ( $C_{18}$ ), quimicamente ligado à sílica, uma vez que este composto interage com compostos orgânicos hidrofóbicos pela acção das forças de *Van der Waals* e, dessa forma, são extraídos da fase aquosa (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003; Reis Filho *et al.*, 2006). De acordo com Rudder *et al.* (2004), a  $EE_2$  foi detectada por meio de ensaios biológicos, sendo que as amostras foram preparadas por tecnologia de SPE, utilizando cartucho  $C_{18}$ .

Relativamente aos métodos de detecção, a matéria orgânica natural pode interferir com a análise de ELISA e GC. A GC-MS-MS é menos susceptível à interferência de matéria orgânica natural do que a GC-MS. A matéria orgânica natural interfere na detecção destes compostos, através do ensaio ELISA, por adsorver aos anticorpos e outras superfícies do sistema de imunoensaio. Na análise GC-MS, a matéria orgânica pode produzir picos interferentes, portanto, é necessário removê-la dos extractos concentrados antes da análise (Huang e Sedlak, 2001).

Em comparação ao GC-MS-MS, a técnica de ELISA tem limites de detecção mais altos, isto é, consegue quantificar menores concentrações. A técnica de ELISA, juntamente com a análise de confirmação por GC-MS-MS, fornece um meio sensível para quantificar compostos estrogénicos em efluentes e em águas superficiais (Huang e Sedlak, 2001).

A questão dos limites de detecção é muito relevante, uma vez que mesmo com técnicas e pré-tratamentos de amostras tão avançados como os descritos muitas vezes ainda é difícil quantificar de forma rigorosa os EDC em estudo. As concentrações dos compostos estrogénicos abaixo dos limites de detecção da GC-MS-MS são uma preocupação, porque a desregulação endócrina por  $E_2$  e  $EE_2$  tem sido relatada, por vários autores, por se encontrarem presentes nos efluentes em concentrações muito baixas (Johnson *et al.*, 2000; Huang e Sedlak, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005). Desta forma, a necessidade de utilização de métodos mais abrangentes para uma identificação sensível e selectiva tem aumentado.

A tradicional GC é limitada, porque muitos contaminantes ambientais são polares, têm baixa volatilidade e são termicamente instáveis. Estes factores levaram ao aumento da utilização de LC-MS-MS nos últimos anos, devido à sua capacidade de analisar estes tipos de moléculas (Vanderford *et al.*, 2003; Reis Filho *et al.*, 2006).

A LC tem várias vantagens para análise de compostos orgânicos em água. Os compostos voláteis representam uma pequena fracção de compostos orgânicos contidos em água e água residual. A maior parte do carbono está presente como compostos não voláteis, que podem ser directamente analisados pela LC e não pela GC. Isto verifica-se especialmente nas águas residuais, uma vez que contêm muito material húmico e compostos orgânicos polares, tais como hidratos de carbono (Reis Filho *et al.*, 2006).

A detecção e medição dos estrogénios na água residual, afluenta e efluente, é um procedimento difícil e caro, pelo que, ainda não constitui uma análise de rotina. É importante salientar que a questão custo não engloba somente os equipamentos, mas as técnicas de preparação da amostra que podem apresentar custos consideráveis, variando amplamente dependendo das matrizes ambientais (Johnson *et al.*, 2000; Veras, 2006).

Na tabela 5.2 apresenta-se uma classificação das técnicas analíticas de detecção tendo em conta os parâmetros de variabilidade, selectividade e sensibilidade para diferentes matrizes ambientais, assumindo-se que houve uma eficiente preparação da amostra.

**Tabela 5.2 - Classificação das técnicas de detecção de EDC para diferentes matrizes ambientais (adaptado de Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003; Veras, 2006)**

Matriz	GC-MS	GC-MS-MS	LC-MS	LC-MS-MS	ELISA
<b>LD fornecido na literatura (ng/l) (*)</b>	0,3 - 2	0,1 - 2	1 - 5	0,1 – 0,5	0,05 - 850
<b>Águas Superficiais</b>	(+)	+	(+)	+	(++)
<b>ETAR (afluente/efluente)</b>	(+)	+	(+)	+	(++)
<b>Águas Residuais</b>	(+)	+	(+)	+	(++)
<b>Solo</b>	(+)	+	(+)	+	(++)
<b>Adubo</b>	(+)	+	(+)	+	(++)

**Legenda:**

(\*) LD - limite de detecção;

+ - pode ser aplicado quando LD e LQ (limite de quantificação) são cumpridos.

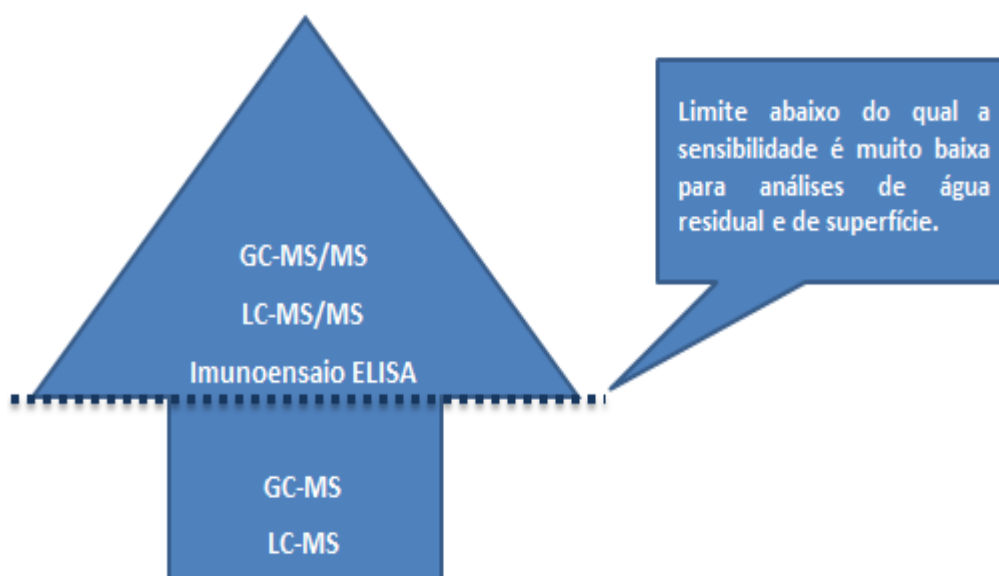
(+) - pode ser aplicado se os problemas de selectividade são solucionados por definição de critérios e se LD e LQ são cumpridos.

(++) - pode ser aplicado se os problemas de selectividade são solucionados por definição de critérios e se atenção é dada aos falsos positivos.

Os EDC mais comuns podem ser detectados usando os métodos de análise química, no entanto, os EDC menos comuns ou ainda não identificados como EDC são susceptíveis de não serem quantificados por esses mesmos métodos nos efluentes da ETAR.

Assim, de forma complementar às determinações analíticas tradicionais e para medir a actividade estrogénica global, os ensaios biológicos podem fornecer uma importante informação na caracterização mais abrangente da actividade e comportamento dos EDC (Lee *et al.*, 2008).

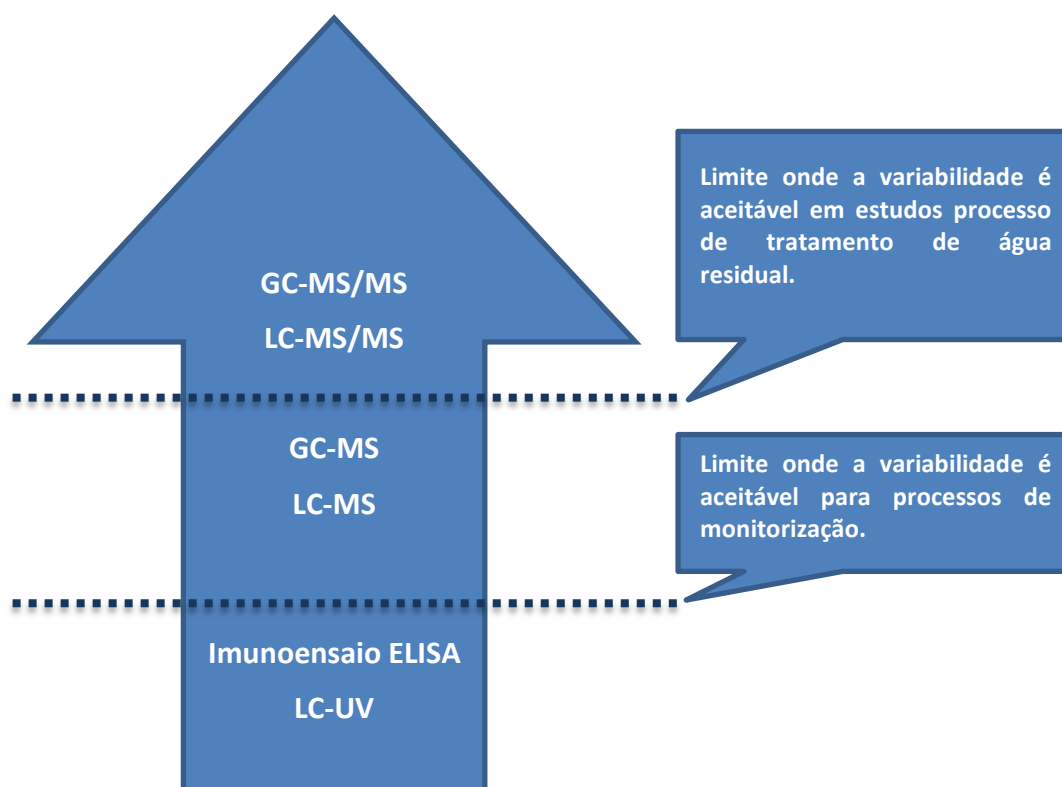
As figuras 5.3 a 5.6 mostram uma visão geral que classifica os métodos de detecção de acordo com os quatro parâmetros que se consideram mais importantes (sensibilidade, variabilidade, selectividade e custos de investimento para a compra de métodos de detecção) a serem considerados na selecção de métodos adequados para a análise de estrogénios.



**Figura 5.3 - Sensibilidade dos métodos de detecção (adaptado de Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003)**

Do ponto de vista de sensibilidade, a GC-MS-MS e a LC-MS-MS são superiores a todos os outros métodos. A GC-MS e a LC-MS são métodos de valor limitado, uma vez que os LD são muitas vezes abaixo do nível de sensibilidade recomendada, tanto para águas residuais e análise de águas de superfície. Os ensaios imunológicos são muito sensíveis, sendo por isso necessário atenção redobrada com a possibilidade de falsos positivos (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003).

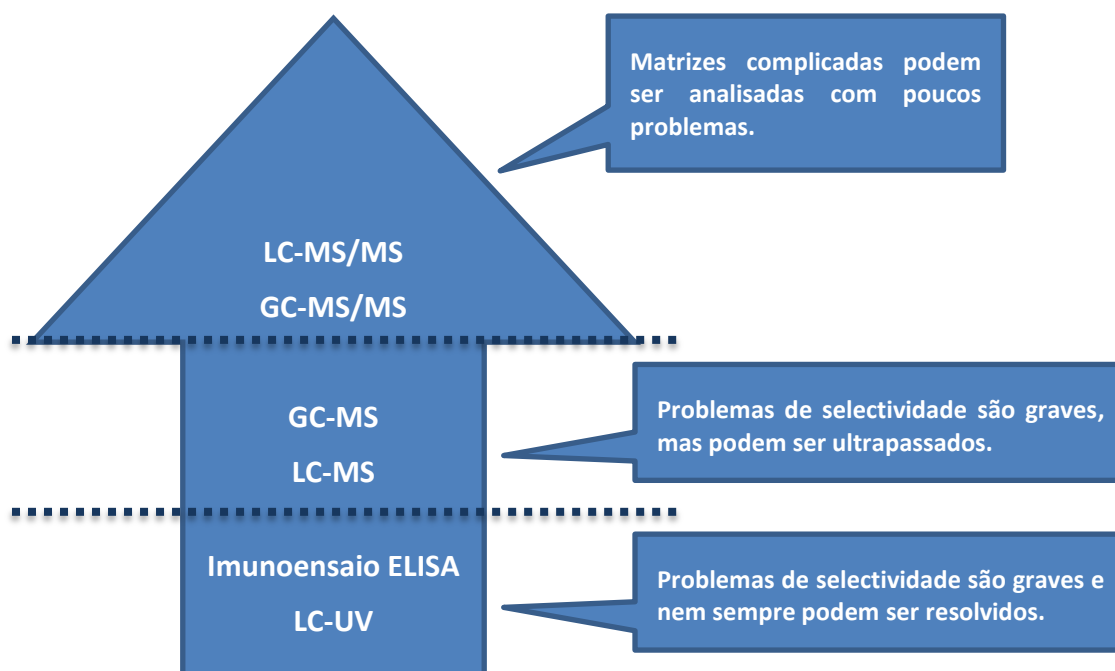
Na figura 5.4 mostra-se a variabilidade dos métodos de detecção.



**Figura 5.4 - Variabilidade dos métodos de detecção (adaptado de Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003)**

Tal como acontece com o parâmetro "sensibilidade", a "variabilidade" é muito melhor quando são usadas GC-MS-MS e LC-MS-MS. Na verdade, foi estabelecida uma linha limite abaixo destes métodos, que exclui o uso de outros métodos em estudos de processo de tratamento de água residual (Figura 3.4). Ambas as técnicas, GC-MS e LC-MS podem ser aplicadas tendo em consideração a variabilidade, para efeitos de monitorização e não de quantificação exacta (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003).

Na figura 5.5 mostra-se a selectividade dos métodos de detecção.



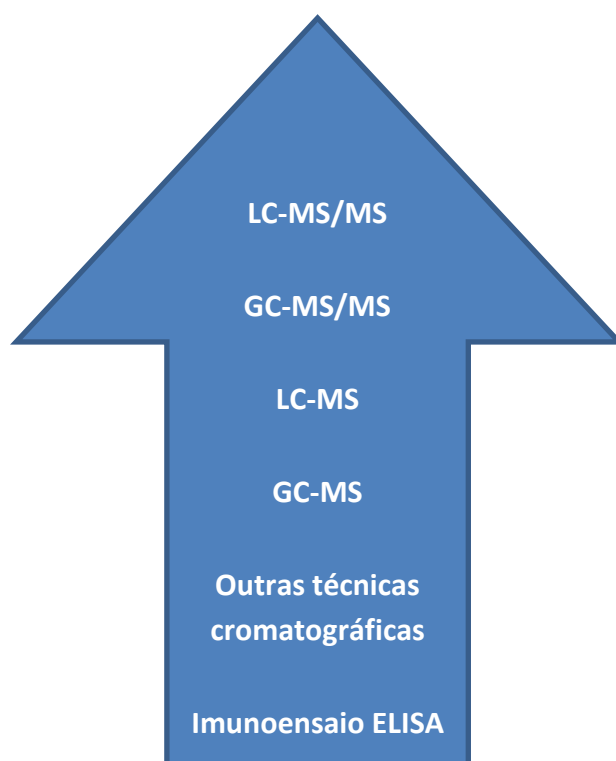
**Figura 5.5 - Selectividade dos métodos de detecção (adaptado de Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003)**

É obtida maior selectividade usando técnicas do tipo GC-MS-MS e LC-MS-MS que são recomendadas para todas as análises de estrogénios mesmo para matrizes complexas como o solo e lamas.

A Figura 5.5 mostra que os instrumentos mesmo com um único detector MS são suficientemente selectivos se os critérios forem previamente discutidos para o método aplicado. A utilização de um só detector MS pode trazer problemas de selectividade graves, contudo, estes podem ser ultrapassados. Os imunoensaios são inadequados se for necessária alta selectividade. Os ensaios imunológicos podem ter problemas de selectividade e por esse motivo actualmente são rejeitados tendo em conta este critério (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003).

Na figura 5.6 mostram-se os custos dos métodos de detecção.





**Figura 5.6 - Custos dos métodos de detecção (adaptado de Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003)**

Os custos inerentes às diferentes técnicas de detecção encontram-se classificados qualitativamente na Figura 5.6. O custo é muitas vezes um critério importante ao seleccionar uma estratégia de análise. As técnicas de imunoensaio possuem baixos custos e são cerca de 35 vezes menos caras do que os métodos mais avançados, tais como a LC-MS-MS e GC-MS-MS. A GC-MS-MS é menos dispendiosa do que LC-MS-MS. A GC-MS é cerca de metade do preço de LC-MS. A preparação de amostras é um passo crucial e seu custo deve ser também considerado. Estes custos de preparação de amostras variam amplamente entre as diferentes matrizes. As amostras menos dispendiosas são as de água de superfície/água subterrânea, enquanto a preparação de amostras para efluentes de ETAR será, provavelmente, cerca de quatro vezes mais cara do que as amostras de água superficial/água subterrânea. A preparação de amostras de efluentes de ETAR será cerca de duas vezes mais cara do que as amostras de água superficial/água subterrânea (Ingerslev e Halling-Sorensen, 2003).



## 6 Sistemas de Tratamento de Águas Residuais

Como referido anteriormente, os estrogénios são excretados maioritariamente, pelo Homem e chegam ao ambiente aquático, principalmente através de efluentes de ETAR.

Uma ETAR é certamente o destino mais adequado para os efluentes que contêm estes compostos promovendo a saúde pública e a preservação dos recursos hídricos, de modo a evitar a sua contaminação (Azevedo, 2008; Gabet-Giraud *et al.*, 2010). No entanto, e como já foi referido anteriormente e decorrente de um ineficaz tratamento nas ETAR, os estrogénios vão estar presentes, em maior ou menor quantidade, nas águas superficiais, dependendo do tipo de tratamento instalado nas ETAR e da sua remoção (Roque, 2009).

As ETAR são, de uma maneira geral, concebidas para a remoção de carbono, azoto e fósforo (C+N+P). No entanto, constatou-se que com o tipo de tratamento instalado nas ETAR, muitas vezes é conseguida, simultaneamente, a remoção parcial de estrogénios. Embora os processos de transformação ou degradação possam eliminar alguns estrogénios da água residual, uma grande ambiguidade persiste sobre o processo de remoção dos mesmos. Por exemplo, as vias de remoção de poluentes orgânicos durante o tratamento biológico secundário incluem processos de adsorção aos flocos microbianos e remoção através das lamas, a degradação química ou biológica, transformação e volatilização durante o arejamento (Rudder *et al.*, 2004; Auriol *et al.*, 2006; Chen e Hu, 2009; Gabet-Giraud *et al.*, 2010).

Os mecanismos de remoção não seguem um padrão, uma vez que a sua contribuição relativa depende das propriedades físico-químicas dos micropoluentes, da origem e composição da água residual, bem como dos parâmetros operacionais do sistema de tratamento de água residual (Azevedo, 2008; Roque, 2009).

A remoção de estrogénios em ETAR é muito complexa e, actualmente, não é bem compreendida. Nos últimos anos tem-se procedido à optimização dos processos de tratamento, para diminuir as quantidades de estrogénios nos efluentes. Na literatura os resultados de remoção de compostos estrogénicos, são comumente apresentados para

sistemas de biomassa suspensa, como por exemplo os sistemas de lamas activadas, no entanto, são também apresentados resultados para os sistemas de biomassa fixa (discos biológicos, filtros biológicos e leitos percoladores) e para vários tratamentos avançados ou combinação de vários tratamentos (osmose inversa, ozonização, carvão activado, membranas). Desta forma conclui-se que são urgentemente necessários estudos adicionais para determinar alternativas de baixo custo, para a remoção destas substâncias potencialmente nocivas dos efluentes (Servos *et al.*, 2005; Roque, 2009; Gabet-Giraud *et al.*, 2010).

O tratamento convencional de água residual é, usualmente, um processo dividido em três etapas que consistem num tratamento preliminar, num tratamento primário, normalmente uma decantação primária e num tratamento secundário que consiste geralmente num tratamento biológico. O tratamento preliminar inclui normalmente uma gradagem e uma etapa de desarenação e desengorduramento (Birkett e Lester, 2003).

## **6.1 Tratamento Preliminar**

O tratamento preliminar envolve a crivagem inicial da água residual bruta através de barras paralelas para remover sólidos inorgânicos de maiores dimensões, a designada operação de gradagem. Uma pequena quantidade de material orgânico putrescível é removida nesta fase e, geralmente, depositados em aterro ou incinerados. A remoção de micropoluentes orgânicos é muito reduzida nesta fase.

Na figura 6.1 mostra-se o diagrama simplificado de uma ETAR.



Figura 6.1 - Diagrama linear simplificado de uma ETAR (adaptado de Birkett e Lester, 2003)

## 6.2 Decantação Primária

A água residual depois de passar pelo tratamento preliminar passa para uma etapa onde os sólidos em suspensão são separados da fase líquida e removidos em órgão como os decantadores primários. Nesta fase os EDC são removidos por adsorção a estes sólidos, que sob a influência da força da gravidade formam as chamadas lamas primárias. O grau de remoção de EDC depende da remoção de sólidos em suspensão, que é controlada pelas características de sedimentação ou flotação das partículas (a sua densidade, tamanho e capacidade de floculação) e da carga hidráulica.

Para além desta relação entre a remoção de sólidos no tratamento primário e a remoção de EDC, Birkett e Lester (2003) e Maurício (2008), estabeleceram uma relação com a idade de lamas que é um parâmetro utilizado em sistemas de biomassa suspensa, nomeadamente em lamas activadas e consiste numa medida do tempo que os microrganismos permanecem dentro do sistema de tratamento. Sabe-se que remoção de compostos orgânicos pode ser afectada pela temperatura e o teor de sólidos do efluente. Uma quantidade significativa de compostos hidrofóbicos, incluindo muitos EDC, é removida da superfície do decantador

primário e adsorvida às lamas antes do tratamento secundário (Birkett e Lester, 2003; Maurício, 2008).

Na figura 6.2 mostra-se o mecanismo de remoção de EDC durante a decantação primária.

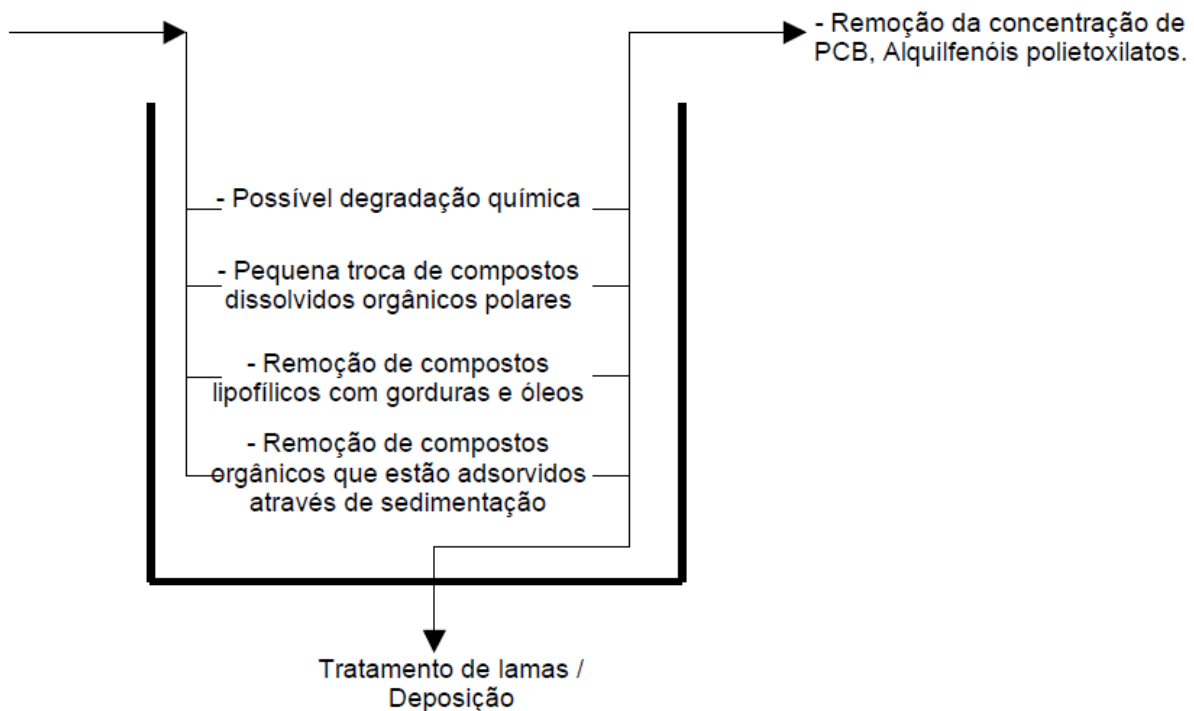


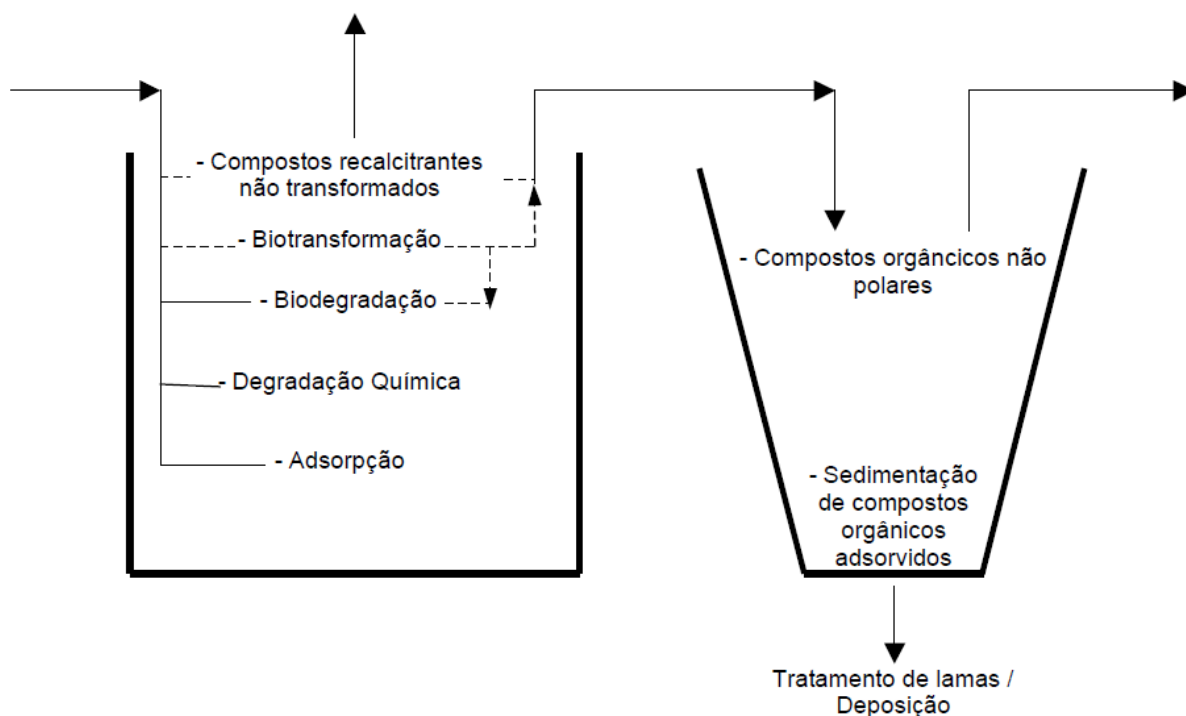
Figura 6.2 - Mecanismo de remoção de EDC durante a decantação primária (adaptado de Birkett e Lester, 2003)

### ***6.3 Tratamento Secundário ou Biológico***

O tratamento secundário ou biológico apresenta várias tecnologias que funcionam sobre princípios semelhantes, podendo envolver processos biodegradativos anaeróbios, contudo, são os sistemas aeróbios intensivos que se destacam, quer por biomassa (microrganismos) suspensa (lamas activadas), quer por biomassa fixa (leitos percoladores e biodiscos ou discos biológicos).

A remoção de EDC nesta etapa inclui processos de adsorção destes poluentes aos flocos microbiológicos e consequente remoção nas lamas secundárias, processos de degradação biológica e química e transformação e volatilização durante o arejamento (Birkett e Lester, 2003; Maurício, 2008).

Na figura 6.3 mostra-se o mecanismo de remoção de EDC durante o tratamento secundário.



**Figura 6.3 - Mecanismos de remoção de EDC durante o tratamento secundário numa ETAR (adaptado de Birkett e Lester, 2003)**

### 6.3.1 Leitos Percoladores

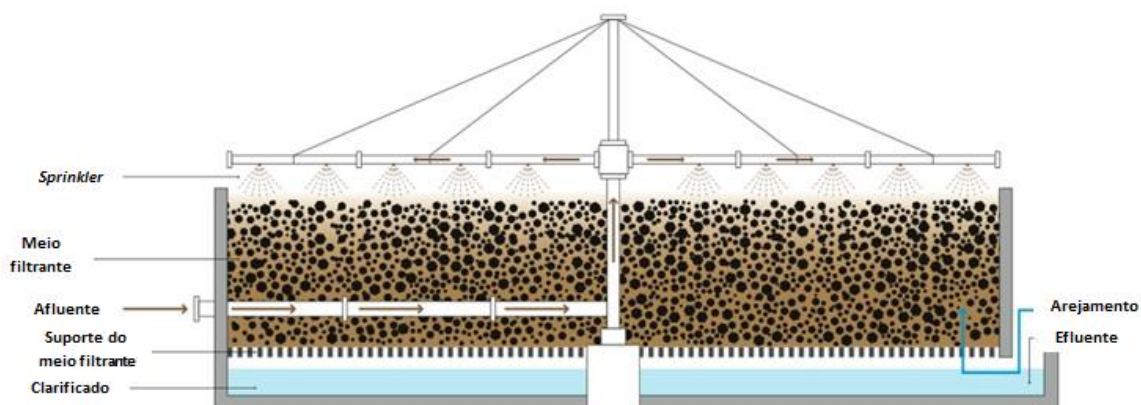
Os leitos percoladores são reactores biológicos de biomassa fixa, cujo meio de enchimento poderá ser constituído por diversos materiais, como pedra ou plástico e onde a água residual é distribuída continuamente.

No sistema de leitos percoladores, após o tratamento preliminar, o efluente passa pelo decantador primário até chegar ao leito percolador. As pedras podem ser utilizadas como meio de enchimento, contudo este meio tem vindo a ser substituído por pequenas peças de

plástico com o intuito de aumentar a capacidade de tratamento, uma vez que estas últimas possuem uma maior superfície específica permitindo assim para o mesmo volume de leito percolador obter quantidades de biomassa consideravelmente superiores.

Neste órgão o efluente entra num distribuidor rotativo, o “*sprinkler*” e vai criar no leito um filme biológico constituído por um aglomerado de bactérias e outros organismos (fungos) que fazem a decomposição da matéria orgânica. O sistema de drenagem é importante, tanto para recolha do efluente líquido, como para a circulação de ar. O efluente recolhido é normalmente encaminhado para um decantador (secundário) onde os sólidos são separados da água residual tratada (fase líquida). Nestes sistemas o efluente recolhido do sistema de drenagem é recirculado para o sistema de alimentação do leito percolador, para aumentar a eficiência de tratamento e também para não deixar que o biofilme seque, o que poderia comprometer a actividade dos microrganismos, levando à consequente ineficiência do sistema (Metcalf e Eddy, 2003).

Na figura 6.4 mostra-se um esquema do funcionamento de um sistema de tratamento através de um Leito Percolador.



**Figura 6.4 - Esquema de um sistema de tratamento por Leitos Percoladores (adaptado de Metcalf e Eddy, 2003)**



### 6.3.2 Discos Biológicos

Os biodiscos ou discos biológicos são sistemas que recorrem também a processos biológicos aeróbios de degradação da matéria orgânica, de filme fixo, à semelhança dos leitos percoladores. O biofilme está aderido a discos rotativos, dispostos de forma paralela uns aos outros, possuem uma espessura reduzida, com rugosidade considerável de forma a permitir uma maior aderência dos microrganismos. Os discos estão parcialmente mergulhados na água residual a ser tratada e enquanto giram, promove-se uma mistura do conteúdo do reactor, e o oxigénio do ar entra nessa massa de água garantindo aos microrganismos um contacto com o oxigénio (quando não estão mergulhados) e com matéria orgânica. Para além disso a massa de água ao ser oxigenada garante que o processo ocorra de forma aeróbia (Metcalf e Eddy, 2003).

Na figura 6.5 mostra-se uma representação esquemática do funcionamento de um sistema de tratamento através de discos biológicos.

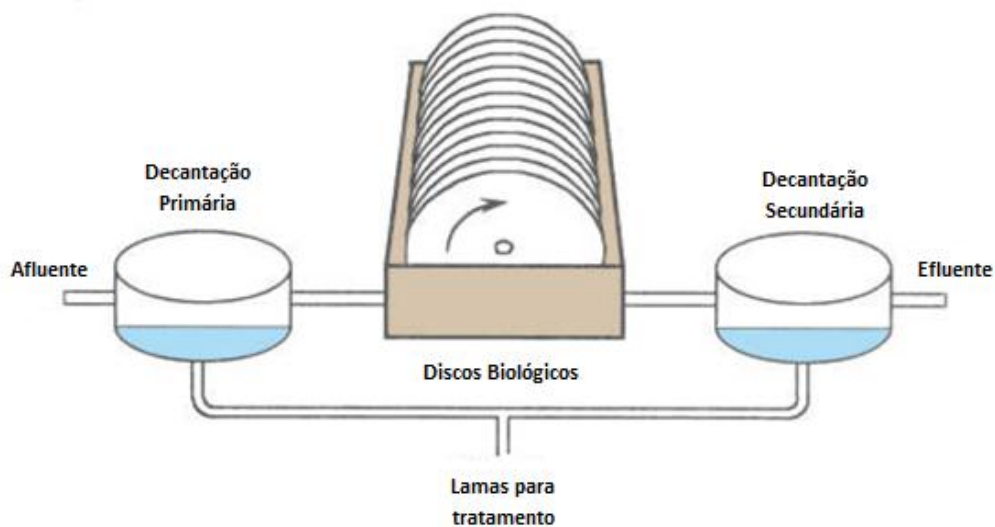


Figura 6.5 - Esquema de um sistema de tratamento por Discos Biológicos (Comissão Europeia, 2001)

Os sistemas de tratamento através de biomassa fixa, tanto os leitos percoladores como os discos biológicos, convencionais conseguem uma remoção de EDC (cerca de 80%). Contudo, quando utilizados como tratamento avançado as percentagens de remoção aumentam significativamente (> 95%) (Bila e Dezotti, 2007; Campani *et al.*, 2010).

### 6.3.3 Lamas Activadas

O sistema de tratamento por lamas activadas é um processo biológico de tratamento de águas residuais, realizado por uma comunidade mista e variável de microrganismos, na presença de oxigénio. Deste modo, ocorre a injeção de ar ou oxigénio puro, com o objectivo de promover o contacto entre a matéria orgânica presente na água residual e os organismos aeróbios existentes, permitindo a degradação de compostos orgânicos, fornecendo o oxigénio suficiente para os microrganismos degradarem os compostos orgânicos.

Depois desta etapa o efluente é conduzido para um órgão onde se faça a separação da fase líquida da fase sólida, normalmente num decantador secundário. De força a manter o sistema equilibrado entre a carga afluente e a quantidade de microrganismos presente no tanque de arejamento, efectua-se uma recirculação de lamas para este tanque (Metcalf e Eddy, 2003).

Na figura 6.6 mostra-se o esquema do funcionamento de um sistema de tratamento através de Lamas Activadas.

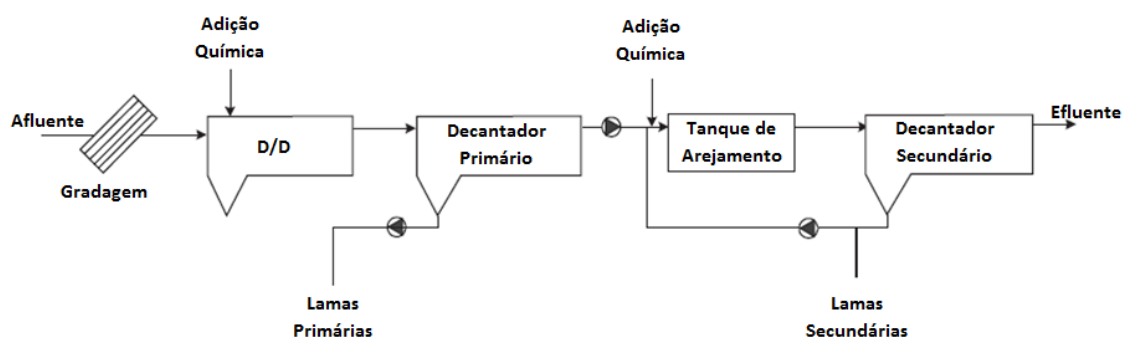


Figura 6.6 - Esquema de um sistema de tratamento por Lamas Activadas (adaptado de Svenson *et al.*, 2003)

Os sistemas de tratamento através de lamas activadas são bastante comuns. Estes conseguem a remoção de EDC (> 90%) (Bila e Dezotti, 2007; Campani *et al.*, 2010).

#### 6.3.4 Biorreactores de Membranas

O processo de tratamento através de membranas está cada vez mais utilizado na remoção de contaminantes da água e tratamento avançado de águas residuais. Em comparação com processos convencionais, a sua grande vantagem é a alta qualidade do efluente final, incluindo extremamente baixas concentrações de compostos orgânicos e até a remoção de bactérias e vírus, sem ser necessária uma desinfecção química. Nos últimos anos, as pesquisas sobre remoção de EDC pelo processo tratamento através de membrana tem aumentado bastante. Esta pesquisa pode ser classificada em três categorias: (1) propriedades físico-químicas dos EDC na rejeição efectiva de membrana, (2) influência do módulo de membrana na rejeição dos EDC, e (3) outros factores que influenciam, como a incrustação na membrana ou a presença de solutos orgânicos no efluente (Liu *et al.*, 2009).

Existem alguns resultados sobre a eficiência de remoção de EDC tecnologias de tratamento através de biorreactores de membrana (MBR), microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) (Lee *et al.*, 2008).

O conceito de biorreactores de membrana consiste na utilização de um bioreactor e de microfiltração como um único processo no tratamento de águas residuais, esta filtração envolve a separação de partículas e matéria coloidal num liquido, o que no caso das membranas abrange um intervalo de filtração para valores desde 0,0001 a 10,0 µm incluindo matéria dissolvida. O papel das membranas num MBR é servir de barreira selectiva que permita a passagem de alguns constituintes e retenção de outros (Metcalf e Eddy, 2003; Tavares, 2008; Roque, 2009).

Os sistemas de biorreactores de membrana têm, no entanto, capacidade para operar a concentrações de sólidos mais elevadas (15.000 a 25.000 mg/l) (Metcalf e Eddy, 2003).

Na figura 6.7 mostra-se o esquema do funcionamento de um sistema de tratamento através de um MBR, acoplado com NF e OI.

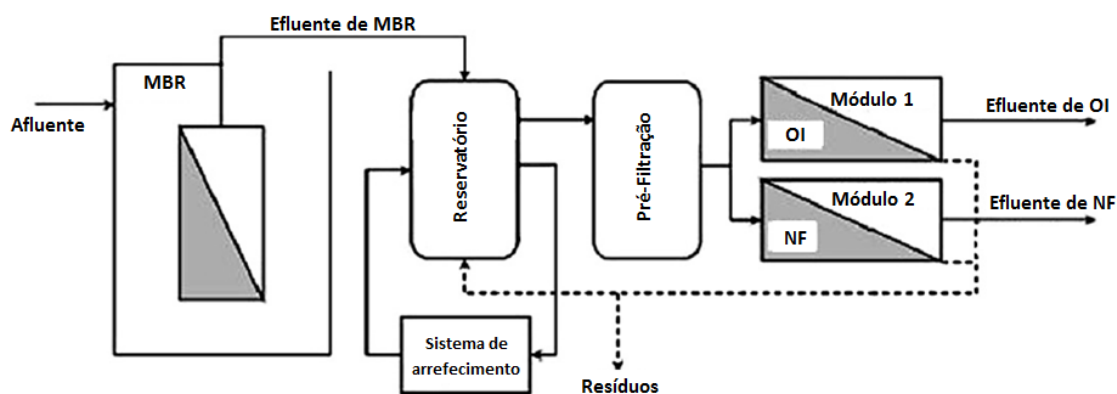


Figura 6.7 - Esquema de um MBR acoplado com NF e OI (adaptado de Lee *et al.*, 2008)

## 6.4 Tratamento Terciário ou Tratamentos Avançados

Vários autores relatam que a remoção de EDC não é feita na totalidade pelos processos convencionais de tratamento em ETAR. Assim, têm sido investigados e desenvolvidos novos processos de tratamento de águas residuais, por forma a evitar grandes descargas de compostos estrogénicos nos sistemas aquáticos (Bila e Dezotti, 2007; Roque, 2009).

Neste sentido, os processos oxidativos têm ganho especial importância e atenção como complemento ao tratamento convencional de águas residuais. Estudos recentes mostram que os processos oxidativos, tais como, ozonização e os POA (Processos Oxidativos Avançados) são tecnologias promissoras na remoção dos compostos em estudo nesta dissertação. Outros tratamentos também foram investigados na remoção de EDC em sistemas aquáticos, como filtração em carvão activado, processos com membranas de nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI) (Bila e Dezotti, 2007).

A ozonização tem sido considerada como uma tecnologia promissora na remoção de estrogénios naturais e sintéticos de água potável e efluentes de ETAR, alcançando altas remoções (> 97%, para  $E_2$  e  $EE_2$ ). O ozono pode ser utilizado no tratamento de águas residuais para o controlo de odores, bem como nos processos avançados de tratamento de

água residual, removendo os compostos orgânicos solúveis refractários (Metcalf e Eddy, 2003; Roque, 2009). Em alguns estudos, após aplicação do tratamento por ozonização, apesar da actividade estrogénica ter diminuído consideravelmente, uma estrogenicidade residual permaneceu, provavelmente, devido aos subprodutos de oxidação (Bila e Dezotti, 2007).

Os POA envolvem a geração de um oxidante não-específico, altamente reactivo, denominado por radical hidroxilo ( $\text{OH}^*$ ), capaz de destruir uma vasta gama de poluentes orgânicos nas águas e águas residuais (Metcalf e Eddy, 2003).

Os POA estudados na remoção de EDC de ambientes aquáticos foram especialmente o  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ , fotocátalise,  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ . Sob condições de tratamento reais, os EDC foram oxidados com  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  e o Reactivo de Fenton ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ). A fotocátalise com  $\text{TiO}_2$  tem sido bastante estudada na degradação de estrogénios ( $\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$ ) e a utilização de  $\text{MnO}_2$  como oxidante tem obtido bons resultados na remoção de  $\text{EE}_2$  (Metcalf e Eddy, 2003; Rudder *et al.*, 2004; Bila e Dezotti, 2007; Roque, 2009).

O carvão activado granular (CAG) é comumente usado nos sistemas de tratamento de água para remoção de micropoluentes. Alguns autores investigaram o uso de processos de filtração com carvão activado na remoção dos EDC, tais como,  $\text{E}_2$  e  $\text{EE}_2$  e os resultados mostraram que são alcançadas remoções (> 99%, para  $\text{E}_2$  e  $\text{EE}_2$ ) concentrações iniciais muito baixas do poluente (Bila e Dezotti, 2007).

Na tabela 6.1 mostram-se alguns exemplos de tecnologias utilizadas nos POA.

**Tabela 6.1 - Exemplos de tecnologias usadas nos POA (adaptado de Metcalf e Eddy, 2003)**

POA que envolvem Ozono ( $O_3$ )	POA que não envolvem Ozono ( $O_3$ )
$O_3+UV$	$H_2O_2+UV$
$O_3+H_2O_2$	$H_2O_2+UV+Fe^{2+}$ (Reagente de Fenton)
$O_3+UV+H_2O_2$	Fotocatálise ( $UV+TiO_2$ )
$O_3+TiO_2$	Radiação Gama ( $\gamma$ )
$O_3+TiO_2+H_2O_2$	

## **7 Sistemas de Tratamento de Biomassa Fixa Vs. Sistemas de Tratamento de Biomassa Suspensa**

É importante referir que, embora as ETAR não sejam projectadas para a remoção de EDC, os sistemas de tratamento de águas residuais convencionais conseguem remover parcialmente os compostos em estudo nesta dissertação. Contudo, a eficiência dessas remoções pode ser melhoradas com um tratamento terciário adicional, ou o processo de tratamento pode ser manipulado ou adaptado de forma a obterem-se maiores remoções.

Assim, e para dar cumprimento aos objectivos estabelecidos para este trabalho, foi efectuada uma comparação entre as concentrações dos compostos seleccionados presentes em ETAR, bem como das eficiências de remoção, através de diferentes sistemas de tratamento.

### ***7.1 Estudos de concentrações em ETAR***

Os estrogénios  $E_1$ ,  $E_2$  e  $EE_2$  recebem especial atenção em vários estudos, dado o seu potencial negativo no ambiente, principalmente nos meios aquáticos, uma vez que são continuamente descarregados nos efluentes. Estas hormonas podem ser encontradas nas ETAR na sua forma livre, podendo ocorrer processos de transformação durante o processo de tratamento. Recentes estudos laboratoriais demonstram que o estrogénio natural mais abundante, o  $E_2$ , é rapidamente degradado e transformado em  $E_1$  (entre 3 - 4h), nos efluentes de ETAR (Larsson *et al.*, 1999; Rodgers-Gray *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2005).

Nas tabelas 7.1 e 7.2 mostram-se as concentrações, localização e método de detecção dos compostos em estudo, em diferentes países.

**Tabela 7.1 - Concentrações e métodos de detecção do E<sub>2</sub>**

Composto	Classe	Concentrações no ambiente	Método de Detecção	Condições	Referências
<b>17β-estradiol (E<sub>2</sub>)</b>	Estrogénio natural	15 ng/l	SPE/GC-MS-MS	Água residual/Alemanha	Ternes et al., 1999
		6 ng/l		Efluente de ETAR/Canadá	
		21 ng/l		Água residual/Brasil	
		6 - 9 ng/l	-	Água natural/EUA	Kolpin et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		<0,6-12 ng/l	SPE/GC-MS-MS	Efluente de ETAR/Países Baixos	Belfroid et al., 1999
		<0,3-5,5 ng/l		Água superficial/Países Baixos	
		<0,5-20 ng/l	SPE/LC-MS-MS	Água residual/Itália e Holanda	Johnson et al., 2000
		<0,5-7 ng/l		Efluente de ETAR/Itália e Holanda	
		11-17 ng/l	SPE/GC-MS	Afluente de ETAR/França	Cargouët et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		5-9 ng/l		Efluente de ETAR/França	
		1-3 ng/l		Água superficial/França	
		2,7- 48 ng/l	SPE/GC-MS	Efluente de ETAR/Inglaterra	Desbrow et al., 1998
		0,5-7,0 ng/l	SPE/GC-NCI-MS	Água superficial/Inglaterra	Xiao et al., 2001
		1,6-7,4 ng/l		Efluente de ETAR/Inglaterra	
		1,1 ng/l	SPE/GC-MS	Água residual/Suécia	Larsson et al., 1999
		0,5 ng/l		Efluente de ETAR/Suécia	
		5-49 ng/l	-	Lamas de ETAR/Alemanha	Ternes et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		1,5 ng/g		Sedimento marinho/Alemanha	
		0,27-2,67 ng/l	-	Água superficial/EUA	Snyder et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		0,48-3,66 ng/l		Efluente de ETAR/EUA	
		10-31 ng/l	-	Afluente de ETAR/Itália	Laganà et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		3-8 ng/l		Efluente de ETAR/Itália	
		0,002-0,006 µg/l		Água superficial/Itália	
		0,15-5,2 ng/l	SPE/HRGC-MS	Efluente de ETAR/Alemanha	Kuch et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		0,15-3,6 ng/l		Água superficial/Alemanha	
		0,0002-0,002 µg/l		Água potável/Alemanha	

NCI – *Negative Chemical Ionization*

HRGC – *Cromatografia Gasosa de Alta Resolução*



**Tabela 7.2 - Concentrações e métodos de detecção do EE<sub>2</sub>**

Composto	Classe	Concentrações no ambiente	Método de Detecção	Condições	Referências
<b>17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (EE<sub>2</sub>)</b>	Estrogénio sintético	0,005 µg/l	SPE/GC-MS-MS	Água residual/Brasil	Ternes et al., 1999
		0,001 µg/l		Efluente de ETAR/Alemanha	
		0,009 µg/l		Efluente ETAR/ Canadá	
		0,073 µg/l	-	Água natural /EUA	Kolpin et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		<0,2-7,6 ng/l	SPE/GC-MS-MS	Efluente de ETAR/Holanda	Belfroid et al., 1999
		<0,1-4,3 ng/l		Água superficial/Holanda	
		<0,5-10 ng/l	SPE/LC-MS-MS	Água residual/Holanda e Itália	Johnson et al., 2000
		<0,2-2,2 ng/l		Efluente de ETAR/Itália e Holanda	
		0,2-7,0 ng/l	SPE/GC-MS	Efluente de ETAR/Inglaterra	Desbrow et al., 1998
		0,005-0,007 µg/l	SPE/GC-MS	Afluente de ETAR/ França	Cargouët et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		0,003-0,0045 µg/l		Efluente de ETAR/França	
		0,001-0,003 µg/l		Água superficial/França	
		0,3-1,7 ng/l	SPE/LC-ESI-MS-MS	Efluente de ETAR/Itália	Baronti <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		4,5 ng/l	SPE/GC-MS	Água residual/Suécia	Larsson et al., 1999
		2 ng/l		Efluente de ETAR/Suécia	
		2-17 ng/l	-	Lamas Activadas de ETAR/Alemanha	Ternes et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		0,9 ng/l		Sedimento marinho/Alemanha	
		0,25-0,52 ng/l	-	Água superficial/EUA	Snyder et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		0,24-0,76 ng/l		Efluente de ETAR/EUA	
		0,1-8,9 ng/L	SPE/HRGC-MS	Efluente de ETAR/Alemanha	Kuch et al. <i>in</i> Bila e Dezotti, 2007
		0,1-5,1 ng/l		Água biológica/Alemanha	
		0,00015-0,0005 µg/l		Água potável/Alemanha	

ESI – *Interface Electrospray*

HRGC – *Cromatografia Gasosa de Alta Resolução*

Os processos biológicos de tratamento em ETAR, tais como lamas activadas e filtros biológicos, têm mostrado capacidade de reduzir a concentração de certos EDC por biodegradação ou adsorção à biomassa (Campani *et al.*, 2010).

Porém, são vários os factores que podem afectar o desempenho dos sistemas de tratamento de águas residuais. No que diz respeito à eficiência de remoção esta é afectada por parâmetros como a temperatura, o TRH e a idade de lamas, pH, etc., sendo considerados por vários autores como factores-chave que podem afectar a eficiência de remoção (Johnson *et al.*, 2007).

O processo de lamas activadas é um tratamento intensivo biológico em que as bactérias estão suspensas num tanque com arejamento mas em que o TRH normalmente é superior a 3 horas podendo atingir mais de 20 horas. Nos sistemas de tratamento biológicos através de biomassa fixa, o tempo de contacto da água residual com o biofilme é, frequentemente, bastante curto, podendo ser apenas de cerca de 30 min. Assim para melhorar a qualidade do efluente e reduzir a concentração de EDC no efluente, os sistemas de tratamento através de biomassa fixa têm sido utilizados como tratamento terciário. Estes podem incluir um tipo de processo de filtração adicional e ser adaptadas as condições de funcionamento de forma a poder-se aumentar a eficiência de tratamento. (Johnson *et al.*, 2007, Maurício 2008).

No Brasil, de acordo com Ternes *et al.* (1999a) realizou-se a monitorização de estrogénios naturais e do contraceptivo sintético, EE<sub>2</sub>, na ETAR da Penha/RJ. Na água residual doméstica, os estrogénios E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> foram detectados em concentrações de 0,04 e 0,021 µg/l, respectivamente. As taxas de remoção de E<sub>1</sub> observadas foram de 67% para o efluente tratado num leito percolador e 83% para o efluente tratado pelo processo de lamas activadas. Para o E<sub>2</sub>, estas taxas foram de 92 e 99,9% para o efluente tratado num leito percolador e para o efluente tratado pelo processo de lamas activadas, respectivamente.

Para o estrogénio contraceptivo EE<sub>2</sub>, as taxas de remoção na ETAR foram de 64 e 78% para o efluente do leito percolador e para o efluente de lamas activadas.

A tabela 7.3 apresenta as remoções de estrogénios monitorizadas por Ternes *et al.* na ETAR da Penha/RJ.

**Tabela 7.3 - Remoção de estrogénios monitorizados na ETAR de Penha/RJ - Brasil, para sistemas de biomassa fixa e suspensa (Ternes *et al.*, 1999a)**

Substância	Carga de estrogénio na água residual (g/dia)	Remoção (%)	
		Biomassa Fixa	Biomassa Suspensa
<b>Estrona</b>	5,0	67	83
<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>	2,5	92	99,9
<b>17<math>\alpha</math>-etinilestradiol</b>	0,6	64	78

Na ETAR municipal alemã de Frankfurt/Main o efluente bruto foi contaminado por E<sub>2</sub> e E<sub>1</sub> com concentrações médias de 0,015 µg/l e 0,027 µg/l, respectivamente, resultando em cargas de até 1 g/dia. As taxas de remoção avaliadas foram muito inferiores às aquelas obtidas na ETAR brasileira. Por exemplo, as cargas de E<sub>1</sub> e EE<sub>2</sub> não foram reduzidas na ETAR alemã, no entanto, o E<sub>2</sub> foi removido, com redução nas concentrações de cerca de 64%. As diferenças entre as taxas de remoção absoluta das ETAR alemã e brasileira podem ser causadas pelas baixas temperaturas no período de amostragem alemão com -2°C, em média, em comparação com as temperaturas acima de 20°C no Rio de Janeiro (Ternes *et al.*, 1999a).

Num outro estudo, realizado por Janex-Habibi *et al.* (2009), foram identificados três estrogénios nos extractos das águas residuais, incluindo os estrogénios naturais E<sub>2</sub>, o seu metabolito, E<sub>1</sub> e o sintético contraceptivo oral EE<sub>2</sub>. Esses estrogénios foram detectados em efluentes de ETAR de vários países em níveis que vão desde 2,5 ng/l a 52,0 ng/l de E<sub>2</sub>, de 10,5 ng/l a 173,4 ng/l de E<sub>1</sub> e de não detectado a 3,3 ng/l para o EE<sub>2</sub>. Dependendo da diluição nos meios receptores, as concentrações dos estrogénios nas águas de superfície geralmente variam entre não detectados a poucos ng/l para E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e EE<sub>2</sub> e pode atingir até 27 ng/l para o E<sub>2</sub>.

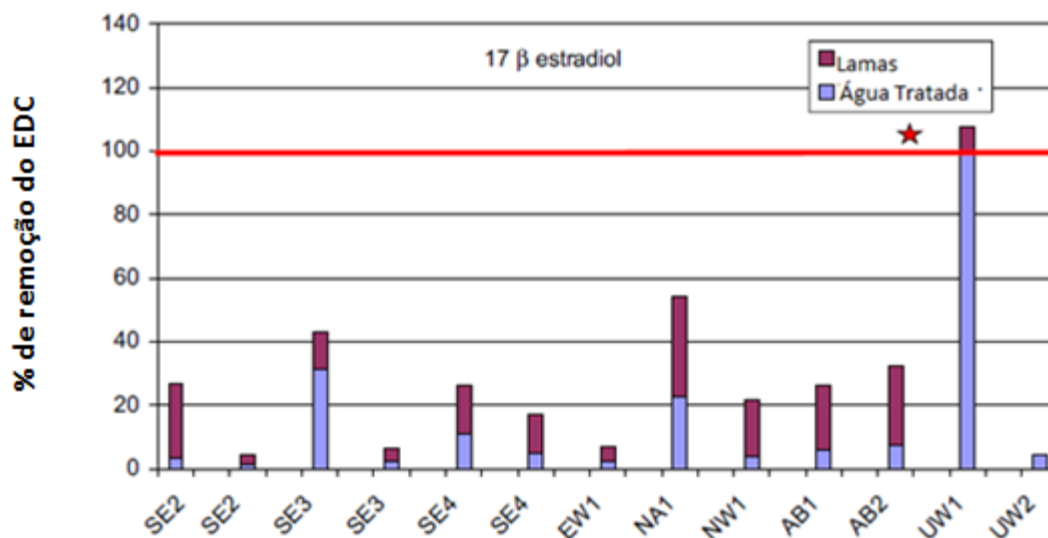
Na tabela 7.4 mostram-se os processos e características de funcionamento das ETAR no estudo de Janex-Habibi *et al.* (2009).

**Tabela 7.4 - Processos e características de funcionamento das ETAR no estudo de Janex-Habibi *et al.*, 2009**

ETAR	País	População (habitantes)	Processo de Tratamento de Água Residual		
				TRH	Idade de Lamas
SE2	França	42 000	LA (remoção de P)	16 h	14 d
SE3	França	55 000	LA (remoção de N e P)	25 h	15 d
SE4	França	102 000	LA (anaeróbio e remoção de N e P)	30 h	17 d
SE5	França	1 000	LP	<10 h	0
SE6	França	22 000	Lagoa	100-140 d	0
EW1	Alemanha	395 000	LA (com zonas anaeróbias e anóxicas e remoção de N e P)	25 h	12 d
NA1	Itália	170 000	LA (anóxico e remoção de N)	5 h	13 d
NW1	Reino Unido	49 350	LA + LP (remoção de N)	6 h	n.d.
NW2	Reino Unido	95 550	1º LP + 2º LP (remoção de N)	<5 h (1º) - <3 h (2º)	n.d.
AB1	Espanha	65 000	LA + filtração terciária	10 h	n.d.
AB2	Espanha	192 800	LA (remoção de N)	22 h	10 d
UW1	EUA	1 900 000	LP + LA (remoção de N)	n.d.	n.d.
UW2	EUA	23 700	SBR	n.d.	n.d.

LA: Lamas Activadas; LP: Leitos Percoladores; SBR: *Sequential Batch Reactor*; n.d.: não disponível.

Tendo em conta as características de tratamento das várias ETAR, os resultados de remoção para o  $E_2$ , segundo Janex-Habibi *et al.*, são os mostrados na figura 7.1.

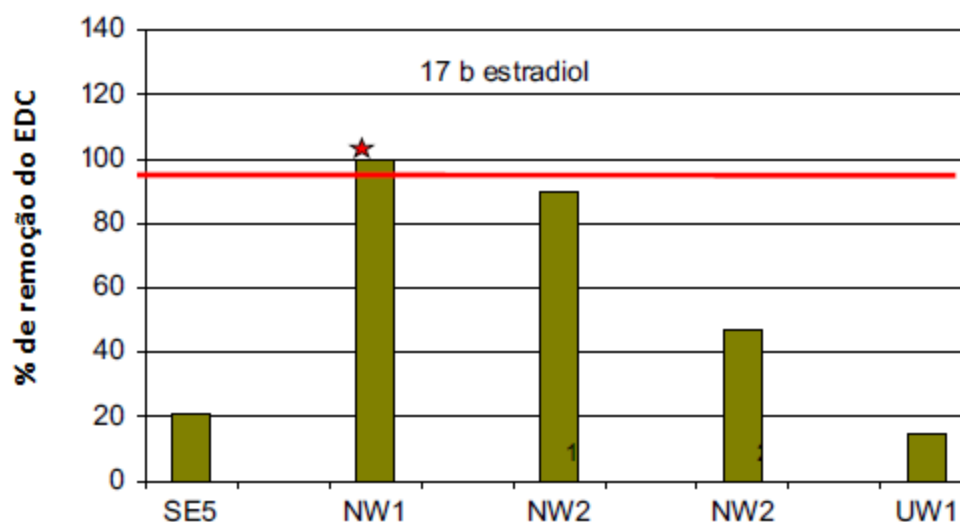


**Figura 7.1 - Percentagem de remoção de E<sub>2</sub> para sistemas maioritariamente constituídos por Lamas Activadas (adaptado de Janex-Habibi *et al.*, 2009)**

Note-se que no caso da ETAR UW1, em que o seu processo de tratamento consistia num leito percolador seguido de lamas activadas, foi registada uma maior eficiência de remoção do composto em estudo.

Alguns autores indicam que idades de lamas e/ou tempos de retenção hidráulico mais elevados, melhoram também o desempenho de remoção de estrogénios (Ternes *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2005). Contudo, os fenómenos de degradação não dependem de um único parâmetro, mas numa combinação de vários parâmetros, como foi referido anteriormente: TRH, idade de lamas e também as concentrações dos compostos no afluente (Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Na figura 7.2 mostra-se a percentagem de remoção de E<sub>2</sub> para sistemas de tratamento através de Leitos Percoladores, no estudo de Janex-Habibi *et al.* (2009).



**Figura 7.2 - Percentagem de remoção de  $E_2$  para sistemas maioritariamente constituídos por Leitos Percoladores (adaptado de Janex-Habibi *et al.*, 2009)**

Na figura 7.2 é visível que para a ETAR NW1 as eficiências de remoção de  $E_2$  são bastante elevadas, sendo o sistema de tratamento composto por lamas activadas seguidas de leito percolador, caso semelhante ao da figura anterior. Para ETAR NW2 estão presentes duas entradas na figura 7.2, que correspondem às eficiências de remoção de cada um dos leitos percoladores que compõem o seu sistema de tratamento. De uma forma geral, no que diz respeito à remoção de estrogénios em sistemas de tratamento de águas residuais, os leitos percoladores apresentam grandes limitações quando funcionam isoladamente, e uma possível explicação poderá estar relacionada com os reduzidos TRH verificados (Janex-Habibi *et al.*, 2009).

Johnson *et al.* (2007) realizaram um estudo, do qual faziam parte dez ETAR com sistemas convencionais de tratamento através de biomassa fixa. Tendo em conta o sistema de tratamento, houve uma média de remoção baixa de  $E_1$ , de cerca de 30% (SD 31,  $n = 18$ ). Não obstante do fraco desempenho de remoção de  $E_1$  observado, a remoção de  $E_2$  foi razoavelmente bem conseguida, cerca de 70% (SD 36,  $n = 17$ ) ainda que irregular, como pode ser constatado pelo elevado desvio padrão dos resultados obtidos. Foi observado que numas ETAR houve pouca ou praticamente nenhuma remoção de  $E_1$  mas, por outro lado, possuem um bom desempenho com a remoção de  $E_2$ .

Desse mesmo estudo faziam parte nove ETAR que podem ser denominadas por sistemas de tratamento através de biomassa fixa avançados, uma vez que possuem processos de tratamento terciário. Ao contrário dos sistemas de biomassa fixa convencionais, neste tipo de sistemas, a eficiência de remoção de E<sub>2</sub> foi semelhante ou melhor do que inicialmente seria previsto. A remoção média de E<sub>2</sub> e E<sub>1</sub> foi de 89% (SD 6, n = 10) e 74% (SD 29, n = 17), respectivamente.

Infelizmente, os estudos existentes sobre o desempenho destes sistemas de tratamento no que diz respeito a moléculas de estrogénio específico são poucos e relativamente difíceis de comparar. Os estudos que incluíram tratamento através de sistemas de biomassa fixa relataram remoções de E<sub>2</sub> de cerca 90% (similar aos sistemas de biomassa suspensa), mas a remoção de EE<sub>2</sub> um pouco menor (64-69%) (Johnson *et al.*, 2007).

Na tabela 7.5 é feita uma comparação das médias de remoção de E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>, em sistemas de biomassa suspensa e biomassa fixa com e sem tratamento terciário. A partir desta análise, Johnson *et al.* verificaram que os sistemas de biomassa fixa com tratamento terciário apresentaram médias de remoção mais elevadas do que os restantes.

**Tabela 7.5 - Remoção de estrogénios para os diferentes sistemas de tratamento (adaptado de Johnson *et al.*, 2007)**

<b>Tipo de Tratamento</b>	<b>Média de remoção de E2 (%)</b>	<b>Média de remoção de E1 (%)</b>
<b>Revisão de Sistemas de Biomassa Suspensa (referido na literatura)</b>	82±11	65±6
<b>Sistemas de Biomassa Suspensa</b>	65 (SD 50, n=6)	72 (SD 48, n=8)
<b>Sistemas de Biomassa Fixa</b>	70 (SD 36, n=17)	30 (SD 31, n=18)
<b>Sistemas de Biomassa Fixa Avançados (com tratamento terciário)</b>	89 (SD 6, n=10)	74 (SD 29, n=17)

Os dados disponíveis indicam que a adição de um estágio de tratamento terciário irá melhorar a remoção biológica de estrogénios em relação aos sistemas de biomassa fixa convencionais (Johnson *et al.*, 2007).

A opção por sistemas de tratamento intensivos (lamas activadas, leitos percoladores), em termos de investimento inicial, poderá tornar-se vantajosa uma vez que apresentam custos iniciais bastante económicos, sobretudo se a opção passar pela reserva de terreno para uma futura expansão do sistema de tratamento, na medida em que este pode assumir um peso relevante no custo global de primeiro investimento (Sardinha *et al.*, 2002).

Refira-se ainda que, para este tipo de instalações o valor de primeiro investimento pode ser expresso da seguinte forma:

$$\text{Primeiro Investimento (€/he)} = K \times \text{População}^N \quad (1)$$

Em que **K** e **N** são constantes empíricas que reflectem o efeito de escala de dimensão da instalação, em termos de população servida (habitante equivalente, he) no custo específico de primeiro investimento (€/he) (Sardinha *et al.*, 2002).

O parâmetro **K** reflecte o custo correspondente à unidade de dimensão considerada (he), enquanto o parâmetro **N** reflecte a economia de escala da tecnologia em questão (Sardinha *et al.*, 2002).

A tabela 7.6 indica os valores de **K** e **N** estimados para as várias tecnologias consideradas para tratamento secundário (sem considerar o custo do terreno e dentro da gama populacional compreendida entre 250 e 2000 he) (Sardinha *et al.*, 2002).



**Tabela 7.6 - Valores das constantes K e N para a estimativa de custos de primeiro investimento, para as tecnologias de tratamento secundário consideradas (adaptado de Sardinha *et al.*, 2002)**

	Parâmetro		
	K	N	r <sup>2</sup>
<b>Lamas Activadas</b>	22828	-0,6628	0,994
<b>Leitos Percoladores</b>	20705	-0,6392	0,990

Assumindo como exemplo uma população de 1000 he, é possível comparar os custos de primeiro investimento entre sistemas de tratamento através de lamas activadas e sistemas de tratamento através de leitos percoladores, utilizando a expressão referida em (1) e os parâmetros da tabela 7.6. Desta forma tem-se que:

- Lamas Activadas:

$$\text{Primeiro Investimento} = 22828 \times (1000)^{-0,6628} \approx 142,14 \text{ €/he}$$

- Leitos Percoladores:

$$\text{Primeiro Investimento} = 20705 \times (1000)^{-0,6392} \approx 160,72 \text{ €/he}$$

Apesar do custo de investimento inicial ser ligeiramente superior no caso dos leitos percoladores, este é rapidamente recuperado na fase de exploração, uma vez que os custos energéticos são inferiores nos sistemas de biomassa fixa (leitos percoladores) quando comparados com os sistemas de biomassa suspensa (lamas activadas).

Vários investigadores (Johnson *et al.*, 2000; Auriol *et al.*, 2006) têm relatado várias taxas de remoção de EDC para os efluentes tratados pelo processo de lamas activadas, com os seguintes resultados: E<sub>1</sub> (60-75%), E<sub>2</sub> (acima de 85%) e EE<sub>2</sub> (65-85%). No entanto, outros estudos (Lee *et al.*, 2008) têm relatado que o processo de lamas activadas alcança altas eficiências de remoção de E<sub>2</sub> e EE<sub>2</sub>, mas baixa remoção de E<sub>1</sub>. No entanto, os biorreactores de membrana (MBR) são considerados um processo de tratamento relativamente melhor

para a remoção de EDC (cerca de 98% para E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>, um pouco menor para EE<sub>2</sub>, cerca de 71%), em comparação com os processos convencionais (Lee *et al.*, 2008).

As diferenças de remoção são consideráveis, as ETAR monitorizadas diferem entre si em vários aspectos, incluindo o tipo, a população bacteriana, o modo operacional e condição (tais como a temperatura e o tempo de retenção de lamas), bem como a composição do afluente de águas residuais (Li *et al.*, 2005).

Uma nova estratégia na remoção de EDC dos efluentes finais de ETAR pode passar pela implementação de uma etapa complementar de biocatalisador, após o tratamento convencional. Com este objectivo, Rudder *et al.* (2004) exploraram o uso de dióxido de manganês (MnO<sub>2</sub>) como substrato de remoção oxidativo. O MnO<sub>2</sub> é um conhecido oxidante da fase sólida, e as suas reacções *redox* com xenobióticos químicos têm sido estudadas. A degradação de substâncias como ácidos húmicos e fúlvicos, atrazina, hidroxilaminas, ácido ascórbico é conhecida por acontecer mais rapidamente na presença de MnO<sub>2</sub>.

Em águas naturais, a fonte principal de manganês é o Mn (II). Rudder *et al.* (2004) que propõem que a oxidação de Mn (II), em ambientes ricos em ácidos húmicos, é um possível mecanismo, no qual as bactérias podem utilizar o carbono contido nas substâncias húmicas. Depois de ser oxidado, o manganês precipita em torno das células ou acumula sobre as camadas da biomassa. Rudder *et al.* (2004) referem ainda que este precipitado de manganês oxida os ácidos húmicos e fúlvicos libertando compostos orgânicos de baixo peso molecular, tais como piruvato, acetona, formaldeído e acetaldeído. Embora historicamente a maioria das pesquisas sobre as bactérias que oxidam o Mn (II) se concentre em espécies de *Bacillus*, *Leptothrix discophora* e *Pseudomonas putida*, novos microorganismos têm sido recentemente estudados para oxidar o manganês, indicando que a oxidação microbiológica de Mn é difundida na natureza (Rudder *et al.*, 2004).

Estes organismos poderiam ter uma grande vantagem quando utilizados em ambientes contendo manganês e em presença de carbono orgânico, por exemplo, os EDC. Além disso, o MnO<sub>2</sub> mostrou absorver metais e compostos orgânicos, aumentando ainda mais a sua

possível utilização como substrato para a remoção de agentes ambientais nocivos da água. O conceito geral é esquematizado na figura 7.3 (Rudder *et al.*, 2004).

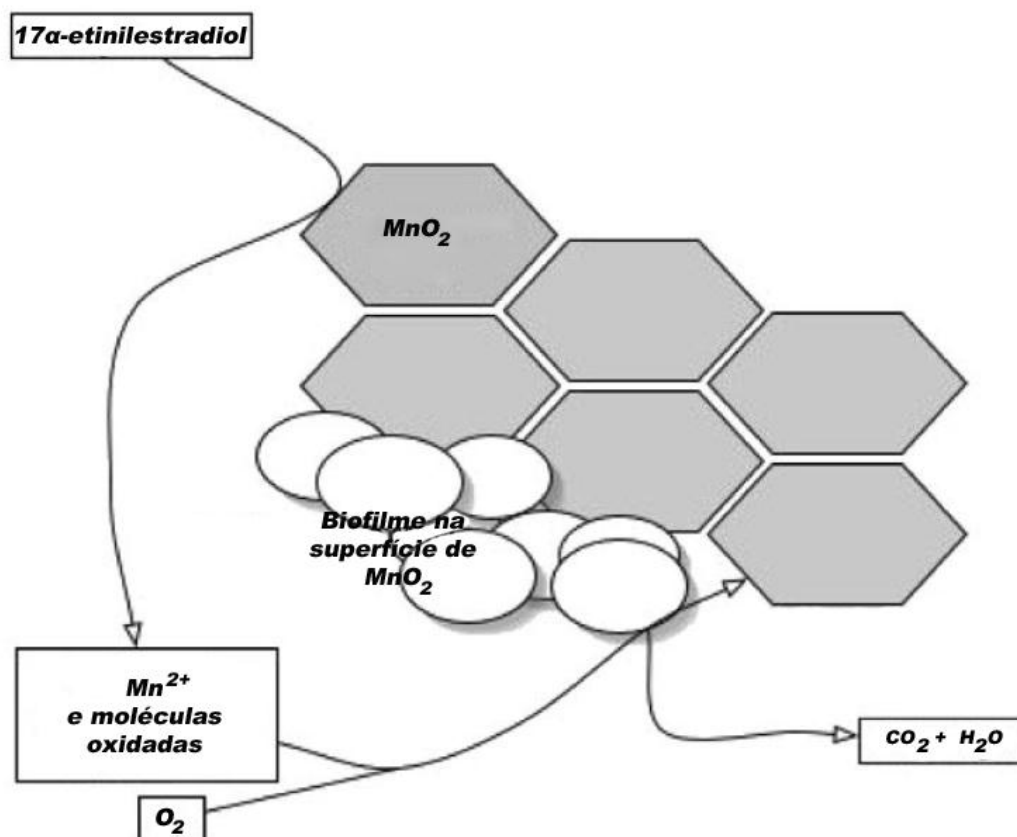


Figura 7.3 - Esquema da degradação de EE<sub>2</sub> através do oxidante MnO<sub>2</sub> (adaptado de Rudder *et al.*, 2004)

O carvão activado granular, CAG, que é conhecido por sua alta capacidade de fixação, terá de ser substituído ou regenerado, muitas vezes, tornando esta técnica muito dispendiosa. Uma possível solução seria a aplicação de uma matriz de auto-regeneração. Na presente experiência, foi testado o MnO<sub>2</sub>. A uma concentração de aproximadamente 15 µg EE<sub>2</sub>/l, o reactor de MnO<sub>2</sub> foi capaz de remover 81,7% da actividade estrogénica. A discrepância entre a eficiência de remoção teórica e experimental faz com que o ciclo de auto-regeneração seja possível e pode concluir-se que tanto a adsorção, como a destruição de EE<sub>2</sub> ocorreram no reactor de MnO<sub>2</sub> (Rudder *et al.*, 2004).



## 8 Conclusões

Os métodos de detecção são uma ferramenta muito importante na identificação de compostos estrogénicos nas águas residuais. A existência de métodos sensíveis, como o Imunoensaio de ELISA e as cromatografias acopladas a espectrometria de massa, são técnicas que permitem determinar as concentrações destes compostos, nas diferentes matrizes ambientais. Infelizmente, os métodos espectrométricos estão associados a instrumentação dispendiosa e requerem pessoal altamente especializado, impedindo a aplicação destes métodos de uma forma mais ampla.

Em relação à remoção de estrogénios em sistemas de tratamento de águas residuais, contrariamente às expectativas é difícil contra-argumentar que os sistemas de tratamento através de biomassa fixa terão um desempenho global inferior aos sistemas de tratamento através de biomassa suspensa na remoção de estrogénios. Assim, os estudos actuais sugerem que:

- Sistemas de tratamento através de LA, com longos TRH e idade de lamas, de uma forma geral têm elevada (mais de 90%) remoção de estrogénios.
- Precipitação (como a remoção química de P) e processos de sedimentação não removem estrogénios.
- Bom desempenho (98% de remoção) através de MBR para estrogénios naturais, mas inferior para o EE<sub>2</sub>.
- Existência de dados insuficientes para concluir que sistemas de tratamento através de biomassa fixa seriam piores do que qualquer outro tipo de tratamento de água residual, na remoção de estrogénios, uma vez que os estudos referidos mostram boa capacidade de remoção destes sistemas (70% para o E2 em sistemas de biomassa fixa convencionais e 89% para E2 quando associado a tratamento terciário, no estudo efectuado por Johnson *et al.* 2007), em comparação com os sistemas de biomassa suspensa (65% para o E2 estudo efectuado por Johnson *et al.* 2007).



## 9 Perspectivas Futuras

Um dos pontos fundamentais neste novo paradigma centra-se na saúde Humana e organismos em geral que deixa de ser “apenas” um direito, para se transformar numa responsabilidade individual e sócio-ambiental que, desde há muito tempo, é necessária. É imperativa uma nova postura do Homem relativamente ao ambiente, com intuito de preservar a integridade da vida (Reis Filho *et al.*, 2006).

Subsistem ainda algumas lacunas no que concerne aos impactos ambientais provenientes dos estrogénios no ambiente. São escassas as informações disponíveis relativamente a bactérias que degradam estes compostos ou a forma como é efectuada a sua degradação físico-química. Deste modo, poderão ocorrer de futuro, estudos que abordem estes temas, tais como:

- A tecnologia ser facilmente disponível;
- Os efeitos de todos os compostos que imitam ou são parecidos com os estrogénios, encontrados no ambiente devem ser determinados, tendo em conta os efeitos que esses mesmos compostos possam provocar;
- A não existência de legislação referente a compostos desreguladores endócrinos é preocupante, tendo em conta o seu potencial negativo no ambiente. É de extrema importância definir políticas adequadas, e dar uma resposta rápida e eficaz a este problema.
- Uma vez que os estrogénios são rejeitados por humanos e animais, estes podem ser um indicador padrão de contaminação nas águas residuais e, desta forma, ajudar a identificar as várias fontes de poluentes.

Uma abordagem fundamental dessa problemática está relacionada com novos estudos de pesquisas aplicadas em tecnologias de detecção, degradação e remoção destes compostos, frequentemente utilizados (Reis Filho *et al.*, 2007).

Contudo, e através do que foi estudado, parece que nos sistemas convencionais apenas com tratamento secundário, os sistemas de biomassa suspensa removerão uma maior

percentagem de EDC quando comparados com os sistemas convencionais de biomassa fixa. No entanto, também parece que quando os sistemas de biomassa fixa são incluídos na linha de tratamento, mas apenas no tratamento terciário, a remoção destes compostos é igualmente ou até mesmo superior, quando comparada com sistemas de biomassa suspensa.

Desta forma, será interessante, futuramente, estudar a aplicação de sistemas de biomassa fixa (enquanto tratamento avançado), uma vez que os seus custos de exploração e nalguns casos os custos de investimento (leitos percoladores) são inferiores, representando, por isso, uma óbvia vantagem face aos sistemas de biomassa suspensa e dessa forma poderem ser adoptados em futuras ampliações / adaptações às ETAR para remoção dos EDC.



## 10 Bibliografia

Auriol, M., Filali-Meknassi, Adams, C. D., Y., Tyagui, R. D., Noguerol, T., Piña, B. (2008). Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, **70**: 445–452.

Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagui, R. D., Adams, C. D., Surampalli, R. Y. (2006). Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, **41**: 525-539.

Azevedo, R. T. (2008). Tecnologias de tratamento de águas residuais urbanas. *Naturlink*. [consultado a 21 de Maio de 2011].

Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J., Cofino, W. P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, **225**: 101-108.

Bila, D. M. e Dezotti, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, **Vol. 30, Nº 3**: 651-666.

Birkett, J. W. e Lester, J. N. (2003). *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1<sup>st</sup> Ed., Lewis Publishers. London, England.

Braga, O., Smythe, G. A., Schäfer, A. I., Feitz, A. J. (2005). Fate of Steroid Estrogens in Australian Inland and Coastal Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science Technology*, **39**: 3351-3358.

Campani, D. B., Marques, D., Müller, G., Centeno, G. (2010). *Esteróides em águas residuárias – Estado da Arte e Perspectivas de Tratamento*. VII Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. Porto Alegre. Brasil.

Chen, X., Hu, J. (2009). Degradation of 17 $\beta$ -estradiol and its conjugates: Effects of initial concentration and MLSS concentration. *Process Biochemistry*, **44**: 1330–1334.

Christiansen, L. B., Winther-Nielsen, M., Helweg, C. (2002). Feminisation of fish: The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. *Danish EPA Environmental Project*, **729**.

Cirja, M., Ivashechkin, P., Schäffer, A., Corvini, P. F. X. (2008). Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Environmental Science Biotechnology*, **7**: 61–78.

Comissão Europeia (1999). *Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos: substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais*. Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu. **COM (1999) 706**.

Comissão Europeia (2001). *Guia de processos extensivos de tratamento de águas residuais adaptados a pequenas e médias aglomerações (500-5 000 habitantes equivalentes)*. Departamento Internacional da Água, Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias. Luxemburgo.

Comissão Europeia (2008). *Jornal da Oficial da União Europeia*, I-348, **Directiva 2008/105/CE**.

Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J.P., Waldock, M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, **Vol. 32, Nº 11**: 1549-1558.

Diniz, M. E. C. S. (2005). *Contribution to the study of endocrine disruptor compounds in Cyprinids: assessment of effects on fish exposed to final effluent of urban wastewater treatment*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Filosofia em

Engenharia do Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

Diniz, M. S., Maurício, R., Petrovic, M., De Alda, M. J. L., Amaral, L., Peres, I., Barceló, D., Santana, F. (2010). Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach. *Journal of Environmental Sciences*, **22(10)**: 1613–1622.

Duarte, P. A. F. (2008). *Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

Furuichi, T., Kannan, K., Suzuki, K., Tanaka, S., Giesy, J. P., Masunaga, S. (2006). Occurrence of Estrogenic Compounds in and Removal by a Swine Farm Waste Treatment Plant. *Environmental Science Technology*, **40**: 7896-7902.

Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M., Coquery, M. (2010). Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *The Science of the Total Environment*, **408**: 4257-4269.

Gerolin, E. R. R. (2008). *Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré - São Paulo*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Civil. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

Guimarães, T. S. (2008). *Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em água de abastecimento: estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental*. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, Brasil.

Guyton e Hall (2006). *Tratado de Fisiologia Médica e Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças*. 9ª Edição, Elsevier, **pp. 706-713**.

Henriques, M. G. S. (2008). *Hormonas naturais e de síntese, bisfenol a, octilfenol e nonilfenol em águas para consumo humano: optimização do método de análise por SPE-LC-ESI-MS/MS*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre no Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. Lisboa.

Hintemann, T., Schneider, C., Schöler, H. F., Schneider, R. J. (2006). Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Research*, **40**: 2287-2294.

Holbrook, R. D., Love, N. G., Novak, J. T. (2004). Sorption of 17 $\alpha$ -Estradiol and 17 $\beta$ -Ethinylestradiol by Colloidal Organic Carbon Derived from Biological Wastewater Treatment Systems. *Environmental Science Technology*, **38**: 3322-3329.

Huang, C. e Sedlak, D. L. (2001). Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **Vol. 20, Nº 1**: 133–139.

Ingerslev, F. e Halling-Sorensen, B. (2003). Evaluation of Analytical Chemical Methods for Detection of Estrogens in the Environment. *Danish EPA Working Report*, **44**.

Janex-Habibi, M., Huyard, A., Esperanza, M., Bruchet, A. (2009). Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. *Water Research*, **43**: 1565-1576.

Johnson, A. C., Aerni, H., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jürgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M. J., Svenson, A., Wettstein, F. E. (2005). Comparing steroid

estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research*, **39**: 47–58.

Johnson, A. C., Belfroid, A., Di Corcia, A. (2000). Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *The Science of the Total Environment*, **256**: 163-173.

Jonhson, A. C., Williams, R. J., Simpson, P., Kanda, R. (2007). What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers? *Environmental Pollution*, **147**: 194-202.

Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H. (2000). Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, **40**: 1131-1142.

Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P., Förlin, L. (1999). Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, **45**: 91–97.

Lee, J., Lee, B. C., Ra, J. S., Cho, J., Kim, I. S. Chang, N. I., Kim, H. K., Kim, S. D. (2008). Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes. *Chemosphere*, **71**: 1582–1592.

Li, F., Yuasa, A., Obara, A., Mathews, A. P. (2005). Aerobic batch degradation of 17 $\beta$ -estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures. *Water Research*, **39**: 2065–2075.

Liu, Z., Kanjo, Y., Mizutani, S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *The Science of the Total Environment*, **407**: 731-748.

Mathiessen, P. (2003). Peter. Historical perspective on endocrine disrupter in wildlife. *Pure and Applied Chemistry*, **75**: 2197-2206.

Maurício, R. (2008). *Contribuição para o estudo de compostos desreguladores endócrinos (EDC) em estações de tratamento de águas residuais (ETAR): estudo da remoção de EDC numa ETAR com tratamento terciário*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Sanitária. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

Metcalf e Eddy (2003). *Wastewater Engineering: treatment and reuse*. 4ª Edição, McGraw-Hill. New York, EUA, **pp. 661-893**.

Nogueira, J. M. F. (2003). Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitorização dos Sistemas Aquáticos. *Química*, **88**: 65-71.

Pombeiro, A. J. L. (2003). *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*. 4ª Edição, Série Manuais Universitários, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, Portugal.

Purdom, C., Hardiman, P., Bye, V., Eno, N., Tyler C., Sumpter, J., Routledge E. J. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, **8**: 275-285.

Queiroz, S. C. N., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F. (2000). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, **24 (1)**: 68-76.

Reis Filho, R. W., Barreiro, J. C., Vieira, E. M., Cass, Q. B. (2007). Fármacos, ETEs e corpos hídricos. *Ambiente e Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Sciences*, **Vol. 2, Nº 3**: 54-61.

Reis Filho, R. W., de Araújo, J. C., Vieira, E. M. (2006). Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioactivos. *Química Nova*, **Vol. 29, Nº 4**: 817-822.

Rodgers-Gray, T. P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J. E., Waldock, M. J., Sumpter, J. P., Tyler, C. R. (2000). Long-Term Temporal Changes in the

Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. *Environmental Science Technology*, **34**: 1521-1528.

Roque, A. L. R. R. (2009). *Remoção de compostos farmacêuticos persistentes das águas e efeitos no ambiente e na saúde humana*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Sanitária. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

Rudder, J., Van de Wiele, T., Dhooge, W., Comhaire, F., Verstraete, W. (2004). Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2). *Water Research*, **38**: 184-192.

Sanchez, D. C. O. (2006). *Desreguladores endócrinos na indução da vitelogenina em peixes nativos*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Sardinha, J., Ângelo, A., Damasceno, J., Carvalho, M., Bastos, P., Santos, S. (2002). *Soluções tipo para pequenas instalações de águas residuais*. Águas de Portugal.

Schiliró, T., Pignata, C., Fea, E., Gilli, G. (2004). Toxicity and Estrogenic Activity of a Wastewater Treatment Plant in Northern Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **47**: 456-462.

Servos, M. R., Bennie, D. T., Bumison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., Ternes, T. A. (2005). Distribution of estrogens, 17h-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *The Science of the Total Environment*, **336**: 155– 170.

Shore, L. S. e Shemesh, M. (2003). Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Applied Chemistry*, **Vol. 75, Nº 11-12**: 1859-1871.

Silva, L. R. e Ferreira, M. M. C. (2003). Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCB) utilizando parâmetros topológicos. *Química Nova*, **Vol. 26, Nº 3**: 312-318.

Stumpe, B. e Marschner, B. (2007). Long-term sewage sludge application and wastewater irrigation on the mineralization and sorption of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone in soils. *The Science of the Total Environment*, **374**: 282-291.

Svenson, A., Allard, A., Ek, M. (2003). Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research*, **37**: 4433–4443.

Tavares, N. L. F. S. R. (2008). *Reactores biológicos de membranas no tratamento de águas residuais. Estudo prévio – MBR compacto*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, perfil Engenharia Sanitária. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R., Servos, M. (1999a). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, **225**: 81-90.

Tilton, F., Benson, W. H., Schlenk, D. (2002). Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. *Aquatic Toxicology*, **61**: 211-224.

Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Rexing, D. J., Snyder, S. A. (2006). Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, **65**: 1990–1998.

US EPA (1997). Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. *U.S. Environmental Protection Agency*, **Report No. EPA/630/R-96/012**.



Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J., Snyder, S. A. (2003). Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **75**: 6265-6274.

Veras, D. F. (2006). *Remoção dos perturbadores endócrinos 17 $\beta$ -estradiol e p-nonilfenol por diferentes tipos de carvão ativado em pó (CAP) produzidos no Brasil – avaliação em escala de bancada*. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos. Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.

Wise, A., O'Brien, K., Woodruff, T. (2011). Are Oral Contraceptives a Significant Contributor to the Estrogenicity of Drinking Water? *Environmental Science Technology*, **45**: 51-60.

Xiao, X., McCalley, D. V., McEvoy, J. (2001). Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, **923**: 195–204.